

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C12N 15/10, C12Q 1/68		A1	(11) 国際公開番号 WO99/54455
			(43) 国際公開日 1999年10月28日(28.10.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/02121			武田 理(TAKEDA, Osamu)[JP/JP] 〒521-1124 滋賀県彦根市野良田町340-1-811 Shiga, (JP)
(22) 国際出願日 1999年4月21日(21.04.99)			向井博之(MUKAI, Hiroyuki)[JP/JP] 〒524-0102 滋賀県守山市水保町字南川1461-82 Shiga, (JP)
(30) 優先権データ 特願平10/114005 1998年4月23日(23.04.98) 特願平10/315243 1998年11月6日(06.11.98)	JP JP		加藤郁之進(KATO, Ikunoshin)[JP/JP] 〒611-0028 京都府宇治市南陵町1-1-150 Kyoto, (JP)
(71) 出願人（米国を除くすべての指定国について） 寶酒造株式会社(TAKARA SHUZO CO., LTD.)[JP/JP] 〒612-8061 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP)		(74) 代理人 弁理士 細田芳徳(HOSODA, Yoshinori) 〒540-0012 大阪府大阪市中央区谷町二丁目8番1号 大手前M2ビル 細田国際特許事務所内 Osaka, (JP)	
(72) 発明者；および (75) 発明者／出願人（米国についてのみ） 浅田起代藏(ASADA, Kiyozo)[JP/JP] 〒520-3333 滋賀県甲賀郡甲南町希望ヶ丘3-20-9 Shiga, (JP) 上森隆司(UEMORI, Takashi)[JP/JP] 〒520-2141 滋賀県大津市大江三丁目1-16-709 Shiga, (JP) 佐藤好美(SATO, Yoshimi)[JP/JP] 〒520-3031 滋賀県栗太郡栗東町大字緑390-7-C-1010 Shiga, (JP) 藤田朋子(FUJITA, Tomoko)[JP/JP] 〒569-1144 大阪府高槻市大畑町25-10 Osaka, (JP) 三宅一恵(MIYAKE, Kazue)[JP/JP] 〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄三番割34-7 Kyoto, (JP)		(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)	
			添付公開書類 国際調査報告書

(54)Title: METHOD FOR SYNTHESIZING DNA

(54)発明の名称 DNAの合成方法

(57) Abstract

DNA synthesizing reaction promoters containing at least one member selected from the group consisting of acidic substances and cation complexes; a method for synthesizing DNA wherein a DNA synthesizing reaction is effected by using a DNA polymerase in the presence of the above promoters; compositions for DNA synthesizing reactions which contain the above promoters; compositions for DNA synthesizing reactions which contain at least two DNA polymerases having 3'→5' exonuclease activity; a method for synthesizing DNA wherein a DNA synthesizing reaction is effected by using at least two DNA polymerases having 3'→5' exonuclease activity; kits to be used in synthesizing DNA *in vitro* which contain at least two DNA polymerases having 3'→5' exonuclease activity; and kits to be used in synthesizing DNA *in vitro* which contain the above-mentioned promoters and DNA polymerases. Thus, DNA can be synthesized at a higher efficiency than in the conventional DNA synthesizing reactions.

酸性物質及び陽イオン錯体からなる群より選択された少なくとも1種を含有したDNA合成反応促進剤；DNA合成反応を行なうに際し、該促進剤の存在下にDNAポリメラーゼを用いて反応を行なうDNA合成方法；該促進剤を含有したDNA合成反応用組成物；3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを含有したDNA合成反応用組成物；DNA合成反応を行なうに際し、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを使用するDNA合成方法；試験管内DNA合成に使用されるキットであって、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを含有したキット、ならびに試験管内DNA合成に使用されるキットであって、該DNA合成反応促進剤およびDNAポリメラーゼを含有したキット。本発明によれば、従来のDNA合成反応に比べて優れた効率でDNA合成を実施することができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

A E	アラブ首長国連邦	D M	ドミニカ	K Z	カザフスタン	R U	ロシア
A L	アルバニア	E E	エストニア	L C	セントルシア	S D E	スードーン
A M	アルメニア	E S	スペイン	L I	リヒテンシュタイン	S E G	スウェーデン
A T	オーストリア	F I	フィンランド	L K	スリ・ランカ	S I G	シンガポール
A U	オーストラリア	F R	フランス	L R	リベリア	S I K	スロヴェニア
A Z	アゼルバイジャン	G A	ガボン	L S	レソト	S S K	スロヴァキア
B A	ボスニア・ヘルツェゴビナ	G B	英國	L T	リトアニア	S S N	シェラ・レオネ
B B	バルバドス	G D	グレナダ	L U	ルクセンブルグ	S Z N	セネガル
B E	ベルギー	G E	グルジア	L V	ラトヴィア	S Z D	スウェーデン
B F	ブルガリア・ファソ	G H	ガーナ	M A	モロッコ	T D D	チャード
B G	ブルガリア	G M	ガンビア	M C	モナコ	T G G	トーゴー
B J	ベナン	G N	ギニア	M D	モルドバ	T J Z	タジキスタン
B R	ブラジル	G W	ギニア・ビサオ	M G	マダガスカル	T Z Z	タンザニア
B Y	ベラルーシ	G R	ギリシャ	M K	マケドニア旧ユーゴスラヴィア 共和国	T M	トルコメニスタン
C A	カナダ	H R	クロアチア	M L	マリ	T T R	トルコ
C F	中央アフリカ	H U	ハンガリー	M N	モンゴル	U A	トリニティ・トバゴ
C G	コンゴー	I D	インドネシア	M R	モーリタニア	U G G	ウクライナ
C H	スイス	I E	アイルランド	M W	マラウイ	U S S	ウガンダ
C I	コートジボアール	I L	イスラエル	M X	メキシコ	U Z Z	米国
C M	カメルーン	I N	インド	N E	ニジェール	V N	ウズベキスタン
C N	中国	I S	アイスランド	N L	オランダ	Y U	ヴィエトナム
C R	コスタ・リカ	I T	イタリア	N O	ノールウェー	Z A	ユーロースラビア
C L	キューバ	J P	日本	N Z	ニュージーランド	Z W	南アフリカ共和国
C Y	キプロス	K E	ケニア	P L	ポーランド		ジンバブエ
C Z	チェコ	K G	キルギスタン	P T	ポルトガル		
D E	ドイツ	K P	北朝鮮	R O	ルーマニア		
D K	デンマーク	K R	韓国				

明細書

DNAの合成方法

技術分野

本発明は、遺伝子工学分野において有用なDNA合成反応促進剤、DNA合成方法、DNA合成反応用組成物および該DNA合成方法に使用されるキットに関する。

背景技術

遺伝子工学分野の研究においてDNAの合成は種々の目的に使用される。このうちオリゴヌクレオチドのような短鎖のDNAの合成を除けば、そのほとんどはDNAポリメラーゼを利用した酵素的方法により実施されている。従って、DNA塩基配列決定、DNAの標識または部位特異的変異導入のための試薬として、DNAポリメラーゼは高い価値を有している。また最近ではポリメラーゼ・チーン・リアクション（PCR）法や該PCR法と逆転写酵素反応を組合せたりバーストランスクリプション-PCR（RT-PCR）法の開発により、耐熱性DNAポリメラーゼが注目を集め、上記PCR法に適した種々のDNAポリメラーゼが開発され、商品化されている。

現在知られているDNAポリメラーゼはそのアミノ酸配列の共通性から大きく4つのファミリーに分類することができ、中でもファミリーA（ポルI型酵素）とファミリーB（ α 型酵素）が大多数を占めている。それぞれのファミリーに属するDNAポリメラーゼは概ね類似した生化学的特性を有しているが、詳細に比較すると個々の酵素によって基質特異性、基質アナログの取り込み効率、プライマー伸長性の強さおよび速度、DNA合成の様式、エキソヌクレアーゼ活性の付隨、温度、pHなどの至適反応条件、また阻害剤に対する感受性などについて異なる性質を有している。したがって、これまで入手可能なDNAポリメラーゼの

中から用途に最も適した性質を有するものを選んで使用してきた。

例えば、超好熱性古細菌であるピロコッカス フリオサス (*Pyrococcus furiosus*)は、 α 型に属するDNAポリメラーゼを生産しており、すでにその遺伝子も単離されている [ヌクレオティック アシックス リサーチ (Nucleic Acids Research) 第21巻、259 ~265 頁 (1993)]。最近、これまでに知られているDNAポリメラーゼとはまったく構造的な類似のない新規のDNAポリメラーゼが該菌株から発見されている。このDNAポリメラーゼは2種の新規タンパク質が複合体を形成してDNAポリメラーゼ活性を発現する。また、該新規DNAポリメラーゼは強い3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性と優れたプライマー伸長活性とを示し、例えば該酵素をPCRに用いた場合には20 kbもの長さのDNA断片を增幅することが可能である。

一方、DNAポリメラーゼを用いたDNA合成反応では、使用する酵素の選択と同様にその反応条件を適切なものに設定することが重要である。反応条件の主なものとしては反応液の組成、pH、反応温度、錫型およびプライマーの濃度などがあり、使用する酵素や目的に応じてこれらの反応条件を設定しなければならない。しかしながらこのような設定が困難な場合もある。

また、複数のDNAポリメラーゼを組み合わせて使用することによって単独のDNAポリメラーゼでは不可能であった効率のよいDNA合成が可能となることが知られている [プロシーディングズ オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシーズ オブ ザ USA (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、第91巻、第5695~5699頁 (1994)]。該方法は、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼ (例えば上記のピロコッカス フリオサス由来 α 型DNAポリメラーゼ) と該活性を有していないDNAポリメラーゼ [例えばサーマス アクアティカス (*Thermus aquaticus*)由来のDNAポリメラーゼ (Taq polymerase)]とを混合してPCRに使用するという方法であり、LA-PCR法として知られている。この方法により、従来行われてきた1種のDNAポリメラ

ーゼのみを使用するPCRに比べて増幅されるDNAの収量が増加し、かつ、従来のPCRでは増幅できなかった長鎖長のDNAを増幅することできるという効果を発現する。しかしながら、このような効果は上記のように3' → 5'エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素と該活性を有さない酵素との組み合わせに限って発揮される。

上記のようにDNAポリメラーゼを用いたDNA合成反応は遺伝子工学的手法として必要不可欠なものであり、その効率を向上させることは研究などを効率よく行なう上でも重要である。しかしながら現在使用されている反応系は、研究などで利用するに十分に至適化された系とはないという欠点を有する。このため、これまでのDNA合成反応に比べて優れた効率でDNA合成を実施することが可能な方法が求められている。

発明の開示

本発明は前記従来技術に鑑みてなされたものであり、本発明の目的は、(1)DNA合成反応促進剤、(2)該DNA合成反応促進剤の存在下に反応を行なうことを特徴とするDNA合成方法、(3)該DNA合成反応促進剤を含有したDNA合成反応用組成物、(4)3' → 5'エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを含有したDNA合成反応用組成物、(5)DNA合成反応を行なうに際し、3' → 5'エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを使用することを特徴とするDNA合成方法、(6)3' → 5'エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを含有したキット、ならびに(7)前記DNA合成反応促進剤およびDNAポリメラーゼを含有したキットを提供することにある。

本発明者らは銳意研究の結果、酸性物質および陽イオン錯体からなる群より選択された少なくとも1種の共存下においてDNAポリメラーゼによるDNA合成反応の効率が向上することを見い出した。また、3' → 5'エキソヌクレアーゼ

活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを混合した場合に極めて効率のよいDNA合成が起こることを見い出した。さらに、これらの技術を組み合わせることにより、優れた遺伝子増幅反応系を構築し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明の要旨は、

- (1) 酸性物質および陽イオン錯体からなる群より選択された少なくとも1種を含有してなるDNA合成反応促進剤、
- (2) DNA合成反応を行なうに際し、前記(1)記載のDNA合成反応促進剤の存在下にDNAポリメラーゼを用いて反応を行なうことを特徴とするDNA合成方法、
- (3) 前記(1)記載のDNA合成反応促進剤を含有してなるDNA合成反応用組成物、
- (4) 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを含有してなるDNA合成反応用組成物、
- (5) DNA合成反応を行なうに際し、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを使用することを特徴とするDNA合成方法、
- (6) 試験管内DNA合成に使用されるキットであって、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを含有してなるキット、ならびに
- (7) 試験管内DNA合成に使用されるキットであって、前記(1)記載のDNA合成反応促進剤およびDNAポリメラーゼを含有してなるキット、に関する。

発明を実施するための最良の形態

(I) 本発明のDNA合成反応促進剤

本発明のDNA合成反応促進剤は、酸性物質および陽イオン錯体からなる群よ

り選択された少なくとも1種を含有することを1つの大きな特徴とする。本発明のDNA合成反応促進剤は、酸性物質および陽イオン錯体からなる群より選択された少なくとも1種（有効成分）を含有することによりDNAポリメラーゼによるDNA合成反応を促進する作用を発揮しうる。

本発明のDNA合成反応促進剤は、前記酸性物質または陽イオン錯体単独、あるいは酸性物質および陽イオン錯体を含有した混合物であり、DNA合成反応を促進する作用を発揮しうる混合物をいう。また、本発明の「DNA合成反応促進剤」は、酸性物質と陽イオン錯体との複合体が生じる場合、DNAポリメラーゼによるDNA合成反応を促進する作用を発揮しうる物質であれば、かかる複合体をも包含する。

さらに、DNAポリメラーゼによるDNA合成反応を促進する作用を発揮しうる範囲で各種添加剤を添加した混合物も、本発明の「DNA合成反応促進剤」に含まれる。

「DNA合成反応を促進する作用」は、単位時間当たりの新規合成DNA鎖の鎖長やPCRにおける增幅産物量によって調べることができる。また、DNAポリメラーゼ活性測定、例えば、新規合成DNA鎖への標識ヌクレオチド取り込み活性の測定を行なう際に、酸性物質および陽イオン錯体からなる群より選択された少なくとも1種を添加した場合または添加しない場合の活性を比較することによって調べることもできる。かかる「DNA合成反応を促進する作用」には、合成反応の効率を向上させる作用をも包含する。

本発明のDNA合成反応促進剤の作用としては、特に限定するものではないが、例えば、DNAポリメラーゼ活性促進剤として、DNAポリメラーゼに作用してその触媒活性を向上させること、あるいは該促進剤の有効成分の分子上に、DNAポリメラーゼを保持することによって酵素の錆型DNAへの非特異的な相互作用を抑制し、錆型DNAに対して至適量の酵素を提供すること、さらに、錆型DNAに作用し、その立体構造をDNA合成反応が進み易い状態に保つことによ

って、該DNAポリメラーゼの活性を効率よく発揮せしめることにあると考えられる。また、本発明のDNA合成反応促進剤の作用の別の態様としては、鑄型DNAとプライマーのアニーリングの効率を向上させることにあると考えられる。

前記DNA合成反応促進剤に用いられる酸性物質は、DNAポリメラーゼ活性促進剤としてDNA合成反応を促進する作用を有する物質であり、具体的には、電荷的に負の電荷を有する物質またはその塩、なかでも酸性物質またはその塩などが挙げられる。

本発明のDNA合成反応促進剤において、酸性物質を用いた場合、DNA合成反応の進行に伴って増加していく鑄型となるDNAとDNAポリメラーゼとの相互作用を最適化することによりDNA合成反応を促進することができる。

DNA合成反応を促進する作用を有する酸性物質としては、特に限定されるものではないが、例えば、酸性多糖のような酸性高分子物質が挙げられる。また、ポリビニル硫酸、ポリスチレン硫酸、ポリグルタミン酸、ポリアクリル酸、鑄型として機能しないDNA（すなわち、対象となるDNAの合成のための鑄型とはならないDNA）等も使用することができる。なお、本明細書において、「酸性物質」には、その塩をも含む。酸性多糖としては、例えば、フコース硫酸含有多糖、デキストラン硫酸、カラギーナン、ヘパリン、ヘパラン硫酸、ラムナン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸などに代表される硫酸基を含有する硫酸化多糖類、ヒアルロン酸、アルギン酸、ペクチンなどのポリウロン酸などが含まれる。また、フコース硫酸含有多糖としては、例えば、フコース硫酸含有多糖-Fまたはフコース硫酸含有多糖-Uを使用することができる。ここで、フコース硫酸含有多糖-Fとは、例えば国際公開第97/26896号パンフレットに記載の方法により、あるいは国際公開第97/47208号パンフレットに記載の方法により褐藻植物などから得られる、ウロン酸を実質的に含まないフコース硫酸含有多糖をいう。また、フコース硫酸含有多糖-Uとは、前記パンフレットに記載の方法により得られる、ウロン酸を含むフコース硫酸含有多糖をいう。

前記酸性物質の塩としては、DNA合成反応を促進する作用を有するものであれば特に限定されないが、水溶性の塩が好ましい。例えば、デキストラン硫酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、ポリグルタミン酸ナトリウム、ポリスチレン硫酸ナトリウム、ヘパリンナトリウム、ポリビニル硫酸カリウム、デキストラン硫酸カリウム、ヘパリンリチウムなどのアルカリ金属塩などが挙げられる。

前記酸性物質は、DNA合成反応を促進する作用を保持している物質であれば、天然物から単離精製されたものでもよく、化学的または酵素的な合成物でもよい。また、前記酸性物質は、該酸性物質を含有する未精製物または部分精製物であってもよい。さらに、DNA合成反応を促進する作用を保持している範囲で適当な修飾を施されていてもよい。また、DNA合成反応を促進する作用を有する物質であれば、分子量が適当なものとなるような分解操作により得られた物質であってもよく、その後に分子量分画を行ない得られた物質であってもよい。本発明においては、分子量数千以上の酸性物質が好適に使用できる。さらに、これらの物質は単独で、または2種以上を混合して使用することができる。

本発明のDNA合成反応促進剤に用いられる陽イオン錯体は、DNAポリメラーゼによるDNA合成反応を促進する作用を有する物質であればよく、具体的には、電荷的に正電荷を有する錯体またはその塩、なかでも錯陽イオンまたはその錯塩などが挙げられる。

本発明のDNA合成反応促進剤において、陽イオン錯体を用いた場合、錆型DNAとプライマーのアニーリング効率を向上させることができ、その結果として、DNA合成反応を促進することができる。また、従来DNAの增幅が困難であった条件、例えば、低マグネシウム濃度、低プライマー濃度、低酵素量、高GC含有領域の増幅などの条件下でも、目的の増幅断片を得ることができる。さらに、該陽イオン錯体を用いた場合、長鎖DNAのPCRにおいても増幅を促進することができる。

また、前記酸性物質と陽イオン錯体を組合わせることにより、さらにDNA合

成反応を促進することができる。

DNA合成反応を促進する作用を有する陽イオン錯体としては、特に限定されるものではないが、例えば、遷移金属錯体を使用することができる。なお、本明細書において、陽イオン錯体とはその塩をも含有する。

遷移金属錯体としては、DNA合成反応を促進する作用を発揮しうる錯体であればよく、中心原子として、元素周期表〔化学辞典 第1版、東京化学同人〕のVIII族の遷移元素を有する錯体が好適である。該VIII族遷移元素としては、DNA合成反応を促進する作用を発揮しうる錯体を生じる元素であれば特に限定されないが、例えば、コバルト(Co)、ロジウム(Rh)、イリジウム(Ir)等が挙げられる。また、錯体中の配位子としては、特に限定されないが、单座配位子、二座配位子、三座配位子、四座配位子等が挙げられ、例えば、H₂O、NH₃、CO、NO、ピリジン等の中性配位子やH₂NCH₂CH₂NH₂のようなキレート配位子であってもよい。また、反応液中で錯陽イオンとして存在しうる陽イオン錯体であれば、配位子として、例えば、Cl⁻、OH⁻、NO₂⁻、CN⁻、CO₃²⁻等の陰イオン性配位子を含む錯体であってもよい。該錯体中の配位子の種類は、1種であっても複数種であってもよい。さらに陽イオン錯体については幾何異性体、光学異性体ならびに結合異性体が存在するが、DNA合成反応を促進する作用を有するものであれば本発明のDNA合成反応促進剤に含まれる。

遷移金属錯体の具体例としては、例えば、[Co(NH₃)₆]Cl₃、[Co(H₂NCH₂CH₂NH₂)₃]Cl₃、[Co(NH₃)₅(H₂O)]Cl₃、[Co(H₂O)(NH₃)₅]₂(SO₄)₃、[Co(OH)(NH₃)₅]Cl₂、[Rh(H₂NCH₂CH₂NH₂)₃]Cl₃、[Rh(NH₃)₆]Br₃、[Rh(NH₃)₅(H₂O)]Cl₃、[RhCl₂(NH₃)₄]Cl、[Ir(NH₃)₆]Cl₃、[IrCl(NH₃)₅]Cl₂、[Ir(H₂NCH₂CH₂NH₂)₃]I₃などが挙げられる。前記遷移金属錯体は、特に、[Co(NH₃)₆]Cl₃、[Co(H₂NCH₂CH₂NH₂)₃]Cl₃および[Rh(H₂NCH₂CH₂NH₂)₃]Cl₃からなる群より選択された1種以上が好ましい。

前記陽イオン錯体の塩としては、DNA合成反応を促進する作用を有するもの

であれば特に限定されないが、水溶性の塩が好ましい。例えば、塩化物のようなハロゲン化物の塩、硫酸塩のような無機酸の塩、並びに酢酸塩などのような有機酸の塩が挙げられる。即ち、本発明のDNA合成反応促進剤の酸性物質と陽イオン錯体の塩であっても、反応液中で電離した状態になるものであれば、好適に使用できる。

前記陽イオン錯体は、例えば、DNA合成反応を促進する作用を保持している物質であればよい。また、前記陽イオン錯体は、該錯体を含有する未精製物または部分精製物であってもよい。さらに、DNA合成反応を促進する作用を保持している範囲で適当な修飾を施されていてもよい。さらに、これらの物質は単独または混合して使用することができる。

本発明のDNA合成反応促進剤がその合成反応を促進するDNAポリメラーゼには特に限定はなく、例えば、ポルI型DNAポリメラーゼ（大腸菌DNAポリメラーゼI、クレノウ・フラグメント、サーマス アクアティカス (*Thermus aquaticus*)由来のDNAポリメラーゼ (*Taq polymerase*)など）、 α 型DNAポリメラーゼ [上記のピロコッカス フリオサス由来 α 型DNAポリメラーゼ、サーモコッカス リトラリス (*Thermococcus litralis*)由来DNAポリメラーゼ (VENT DNA polymerase)、ピロコッカス sp. (*Pyrococcus sp.*) 由来DNAポリメラーゼ (Pyrobust DNA polymerase, KOD DNA polymerase)、ピロコッカス sp. GB-D (*Pyrococcus sp. GB-D*) 由来DNAポリメラーゼ (DEEP VENT DNA polymerase)など]、これらのどちらにも属さない非 α 非ポルI型DNAポリメラーゼが挙げられる。なお、ポルI型DNAポリメラーゼ、 α 型DNAポリメラーゼはともにそのアミノ酸配列上の相同性から分類される一群の酵素を指し、そのアミノ酸配列上の特徴はヌクレイック アシックス リサーチ、第15巻、4045～4057頁 (1991) に記載されている。

また、非 α 非ポルI型DNAポリメラーゼとしては、例えば国際公開第97/24444号パンフレットに記載のピロコッカス フリオサス由来DNAポリメ

ラーゼが挙げられる。なお、本明細書においては、同じくピロコッカス フリオサスの生産する α 型DNAポリメラーゼと区別するため、前記ピロコッカス フリオサス由来の非 α 非ポリI型DNAポリメラーゼをPfu DNAポリメラーゼIIと記載する。また、前記ピロコッカス フリオサス由来の α 型DNAポリメラーゼはPfu DNAポリメラーゼIと記載する。

Pfu DNAポリメラーゼIIは、以下に示すような性質を有する酵素である。

Pfu DNAポリメラーゼIIの性質：

1) 一本鎖の錆型DNAにプライマーがアニーリングした複合体を基質としてポリメラーゼ活性を測定した場合に、活性化DNAを基質とした場合に比べて高い活性を示す。

2) 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する。

3) λ DNAを錆型としたポリメラーゼ チェーン リアクション(PCR)を以下の条件で行なった場合、他の酵素の添加なしに約20キロ塩基対のDNA断片を増幅することが可能である：

PCRの条件：

(a) 反応液組成：10mM トリス-塩酸(pH 9.2)、3.5mM 塩化マグネシウム、75mM 塩化カリウム、それぞれ0.4mMのdATP, dCTP, dGTPおよびdTTP、0.01% ウシ血清アルブミン、0.1% トリトンX-100、5.0ng/50μl λ DNA、10pmole/50μl プライマー λ A(配列表の配列番号：1) およびプライマー λ B(配列表の配列番号：2)、ならびに3.7U/50μl DNAポリメラーゼを含む；

(b) 反応条件：98°C、10秒～68°C、10分を1サイクルとした30サイクルのPCRを行なう。

4) SDS-PAGE上で約90,000ダルトン、約140,000ダルトンに相当する2種のDNAポリメラーゼ構成タンパク質よりなる。

また、前記 Pfu DNA ポリメラーゼ II をコードする遺伝子はすでにクローニングされており、該遺伝子を含有するプラスミド pFU1001 で形質転換された大腸菌 JM109 は Escherichia coli JM109 / pFU1001 と命名、表示され、平成 7 年 8 月 11 日（原寄託日）より通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（あて名：日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号（郵便番号：305-8566））に受託番号：FERM BP-5579 として寄託されている。したがって、該形質転換体を培養し、得られた培養物より、例えば、国際公開第 97/24444 号パンフレット（28~29 頁、実施例 3）に記載の方法により、前記 Pfu DNA ポリメラーゼ II を取得することができる。

上記のような各種の DNA ポリメラーゼを使用する DNA 合成反応において、その反応液中に本発明の DNA 合成反応促進剤を添加することにより、驚くべきことに該 DNA ポリメラーゼによる DNA 合成の効率が向上する。この場合、2 種以上の DNA ポリメラーゼ、例えば、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する 2 種以上の DNA ポリメラーゼ（例えば、 α 型の DNA ポリメラーゼと非 α 非ポル I 型の DNA ポリメラーゼ）、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する DNA ポリメラーゼと 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有さない DNA ポリメラーゼを使用する場合にも同様に DNA 合成の効率が向上する。

例えば、本発明の DNA 合成反応促進剤を添加した反応液を用いて PCR を行なった場合、添加せず PCR を行なった場合に比較して增幅産物の量が増加する。例えば、本発明の DNA 合成反応促進剤の添加により、従来增幅が困難であった条件下においても、增幅産物を得ることができる。また、增幅産物の量は、例えば、PCR 後の反応液の一定量を電気泳動に供し、電気泳動後のゲルをエチジウムプロマイドなどで染色し、增幅産物に由来するバンドの蛍光の強度をイメージングアナライザーなどを用いて測定することにより定量化することができる。前記のようにして增幅産物の量を定量化し、本発明の DNA 合成反応促進剤を添加した反応液を用いて PCR を行なった場合と添加せず PCR を行なった場合と

を比較した場合、増幅対象物の長さ、G C 含量などにより増減するが、増幅産物量は、約2～5倍の増加が見られる。また、少量の鑄型DNAからも効率よいDNAの増幅が可能である。

さらに、本発明のDNA合成反応促進剤を用いたPCRにおいて、同じ量の増幅産物を得るために要する反応時間が従来のPCRに比べて短縮される。

一般にPCRでは二本鎖鑄型DNAの一本鎖への解離（変性）、一本鎖鑄型DNAへのプライマーのアニーリング、プライマーからの相補鎖合成（伸長）の3つのステップによりDNAの増幅が実施される。また、”シャトルPCR”（『PCR法最前線』、「蛋白質 核酸 酵素」別冊、第41巻、第5号、425頁～428頁（1996））と呼ばれる前述の3ステップ反応のうちプライマーのアニーリングおよび伸長のステップを同一温度で行なう2ステップ反応でもDNAの増幅が実施される。本発明のDNA合成反応促進剤は、特に上記の伸長のステップに要する時間を短縮することができるため、前記3ステップ反応と2ステップ反応のいずれにおいても、合成反応全体に要する時間を短縮することができる。

ここで、従来のPCRによって同じ量の増幅産物を得るために要する反応時間は、例えば、本発明のDNA合成反応促進剤を添加した反応液を用いてPCRを行なった場合の増幅産物量を基準として調べることができる。すなわち、当該促進剤を添加せずに実施されたPCRの各サイクルごとに反応液をサンプリングして、増幅産物の量を前記のようにして定量化し、これが本発明のDNA合成反応促進剤の存在下に得られた増幅量と同一量になるまでのサイクル数を決定し、そのサイクル数と1サイクル当たりの所要時間から算出することにより求めることができる。また、本発明のDNA合成反応促進剤を用いたPCRの1サイクル当たりの所要時間は、通常のPCRの1サイクル当たりの所要時間に比べて短く設定することができる。1サイクル当たりの所要時間は、例えば、3ステップ反応においては、変性、プライマーのアニーリング、プライマーの伸長の各ステップ

の保持時間および変性からプライマーのアニーリング、プライマーのアニーリングからプライマーの伸長、さらにプライマーの伸長から次サイクルにおける変性までの各設定温度になるまでの時間の合計より求めることができる。2ステップ反応においても上記のように各ステップの保持時間および各ステップ間の移行時間の合計より求めることができる。本発明のDNA合成反応促進剤を添加した反応液を用いてPCRを行なった場合の全所要時間と添加せずPCRを行なった場合の全所要時間とを比較した場合、增幅対象物の長さ、GC含量などにより増減するが、約1／2程度まで短縮されうる。

本発明のDNA合成反応促進剤は、增幅反応全体に要する時間を短縮できるため、例えば、PCR法に基づく遺伝子診断法などに使用することによって、より短時間で遺伝子診断法などを行なうことができるという優れた効果を発揮する。

(II) 本発明のDNA合成反応用組成物

本発明のDNA合成反応用組成物としては、一つの態様として、例えば上記の(I)に示されたDNA合成反応促進剤を含有した組成物が挙げられる。該組成物はDNAポリメラーゼを用いたDNA合成に必要な各種成分、例えばdNTP、塩化マグネシウムや適正なpHを保つための緩衝成分を含んでいてもよい。さらにDNAポリメラーゼを含んでいてもよい。

DNA合成反応用組成物に含有されるDNAポリメラーゼには特に限定はなく、上記の(I)に示された各種のDNAポリメラーゼが挙げられる。DNAポリメラーゼは1種の酵素のみが含まれていてもよく、2種以上(複数種)の酵素が含まれていてもよい。例えば、複数種のDNAポリメラーゼを含有する場合、上記のLA-PCRに使用される3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼと有さないDNAポリメラーゼの組み合わせであってもよい。また、耐熱性のDNAポリメラーゼが含有された本発明のDNA合成反応用組成物は、高次構造を形成しやすい塩基配列を有するDNAの合成やPCRへの使用に

適している。

また、本発明のDNA合成反応用組成物の別の態様として、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを含有する組成物が挙げられる。該組成物も上記のようなDNA合成に必要な各種成分および／または上記のDNA合成反応促進剤を含有するものであってもよい。

複数のDNAポリメラーゼを含有する組成物としては、従来、LA-PCR法に利用される組成物が知られていた。上記のように、LA-PCR法に利用される組成物は3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼと、該活性を有さないあるいは該活性を発揮しないDNAポリメラーゼとを組み合わせて調製されている。

なお、ここで「3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する」とは、天然のDNAポリメラーゼが有している3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性が、化学的もしくは遺伝子工学的な方法によって除去、あるいは低減されていないこと、すなわち、該活性を実質的に有していることを意味する。また、「3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を発揮しないDNAポリメラーゼ」とは、化学的もしくは遺伝子工学的な方法によって、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性が除去または低減されたDNAポリメラーゼをいう。

本発明者らは、驚くべきことに3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼどうしを組み合わせた場合にはLA-PCR法よりも反応速度の速いDNA合成反応が達成されることを明らかにした。

このような組成物としては、特に限定するものではないが、例えば α 型に属する耐熱性DNAポリメラーゼと非 α 非ポルⅠ型に属する耐熱性DNAポリメラーゼとを組み合わせた組成物を挙げることができる。また、上記のDNA合成反応促進剤を添加することにより、該組成物の性能はさらに向上する。

該組成物の有する特徴のひとつは単位時間当たりのDNA合成速度が非常に高いことにある。該組成物をPCR法に使用した場合、同一鎖長のDNAの増幅に

要する時間は従来のPCR法、LA-PCR法に比べて短い。従って、従来法ではDNAの增幅が不可能であったPCR条件においてもDNAの增幅が可能である。

本発明のDNA合成反応用組成物は、增幅反応全体に要する時間を短縮できるため、例えば、PCR法に基づく遺伝子診断法などに使用することによって、より短時間で遺伝子診断法などを行なうことができるという優れた効果を発揮する。

(III) 本発明のDNA合成方法

本発明のDNA合成反応促進剤、あるいは本発明のDNA合成反応用組成物を使用して反応液を調製することにより、従来よりも高い効率でDNA合成反応を行なうことができる。例えば、本発明のDNA合成方法をPCR法に利用した場合には、従来のPCR法、またはLA-PCR法よりも短時間の反応で増幅産物を得ることができる。

本発明のDNA合成方法の態様としては、2種以上のDNAポリメラーゼを使用する方法、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼと3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有さないDNAポリメラーゼとを使用する方法、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを使用する方法、 α 型のDNAポリメラーゼと非 α 非ポルI型のDNAポリメラーゼとを使用する方法が挙げられる。さらに前記DNA合成方法をPCR法により行なう方法等も挙げられる。

本発明のDNA合成方法によれば、増幅反応全体に要する時間を短縮できるため、例えば、PCR法に基づく遺伝子診断法などに使用することによって、より短時間で遺伝子診断法などを行なうことができるという優れた効果を発揮する。

また、DNAの標識、ジテオキシ法による塩基配列の決定などのDNAポリメラーゼを利用した操作にも本発明のDNA合成方法を利用することが可能である。

(IV) 本発明のDNA合成方法に使用されるキット

本発明のキットを使用することにより、より簡便に効率よくDNAを合成することができる。このようなキットとしては、DNAの合成を伴う反応に用いられるキットであれば特に限定されるものではなく、試験管内のDNA合成反応を行なうためのキットが挙げられる。具体的には、例えば、ジデオキシ法によるDNA塩基配列決定のためのキット、DNA標識用キット、PCR用キット、cDNA合成用キット、部位特異的変異導入用キットなどが挙げられる。

本発明のキットにおいては、本発明のDNA合成反応促進剤および／または3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを含有することを1つの大きな特徴とする。即ち、一つの態様として本発明のDNA合成反応促進剤を含有するキット、他の態様として3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを含有するキットが挙げられる。さらに本発明においては、本発明のDNA合成反応促進剤と3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼとを含有するキットも含まれる。

DNA合成反応促進剤としては、前記(I)で述べた酸性物質および陽イオン錯体からなる群より選択された少なくとも1種が挙げられ、3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼとしては、例えば α 型のDNAポリメラーゼと非 α 非ポルI型のDNAポリメラーゼが挙げられ、耐熱性DNAポリメラーゼであることが好ましい。本発明のDNA合成反応促進剤を含有したキットは、さらに1種又は2種以上の適当なDNAポリメラーゼを含んでおり、特に、耐熱性DNAポリメラーゼが好適に使用される。前記キットには、いずれの態様においても、例えば、dNTP、塩化マグネシウム、反応液を適正なpHに保つための緩衝成分などのDNAポリメラーゼの反応に必要な試薬を含んでいてもよい。

前記DNA合成反応促進剤およびDNAポリメラーゼは、単独のコンポーネン

トの状態または反応用緩衝液などに添加された状態でキットに含有されていてもよい。

本発明のキットを使用したDNA合成反応は、単位時間あたりのDNA合成量が、通常の反応系で行なった場合に比べ、非常に多いため、DNA標識、PCR、cDNA合成、部位特異的変異導入などに代表されるDNA合成反応を伴う各種の操作に適用した場合、操作に要する時間を短縮できるという優れた効果を発揮する。例えば、前記キットをPCRに適用した場合、同一鎖長のDNAの增幅に要する時間は従来のPCR法やLA-PCR法に比べてより短い。したがって従来法ではDNAの增幅が不可能であったPCR条件下においてもDNAの增幅が可能となる。また、本発明のキットは、增幅反応全体に要する時間を短縮できるため、例えば、PCR法に基づく遺伝子診断法などに使用することによって、より短時間で遺伝子診断法などを行なうことができるという優れた効果を発揮する。

また、本発明のキットを利用し、PCR法により核酸の增幅を行なうことにより、增幅反応全体に要する時間を短縮し、あるいは増幅反応によって得られる産物の収量を向上させることができるという優れた効果を発揮する。この場合、キットに含まれるPCRに必要な試薬を混合して増幅反応液を調製し、さらに当該反応液に酸性物質および陽イオン錯体からなる群より選ばれた少なくとも1種を加えたうえで、変性、アニーリング、伸長の各工程を繰返すサイクル反応を実施する。酸性物質および陽イオン錯体からなる群より選ばれた少なくとも1種は、反応時間の短縮および／または増幅産物の収量の増加に有効な量が添加されなければよい。さらに、本発明のキットを利用したPCR法では、利用しないPCR法に比較して増幅される断片の鎖長が長くなるという優れた効果を発揮する。

上記の反応液には以下のようないかだな成分が含まれる：1) 鑄型となる核酸、2) 適当な反応緩衝液、3) DNAポリメラーゼ、4) dATP、dTTP、dGTPおよびdCTP、5) 少なくとも1つのオリゴヌクレオチドプライマー。酸性物

質および陽イオン錯体からなる群より選ばれた少なくとも1種は、調製後の該反応液にその有効量を添加してもよく、あるいは、反応用緩衝液の成分として添加されていてもよい。

本発明によれば、多くのサンプルを取り扱う、PCR法に基づく遺伝子診断法などに使用することによって、遺伝子診断法などをより短時間に行なうことができるという優れた効果を奏する。

以下に実施例をもってさらに詳細に本発明を説明するが、本発明は実施例の範囲に限定されるものではない。

下記実施例において、市販の酵素の活性は各酵素の表示に基づいて示した。ただし、Pfu DNAポリメラーゼIIの酵素活性単位は、実施例1記載の酵素活性測定方法により得られた値により示した。また、市販の酵素を含む反応液の調製は、特に断りのない限り各酵素の説明書にしたがうか、あるいは添付されている反応用緩衝液を使用して調製した。PCRは特に断りのない限りジーンアンプ PCRシステム9600 (GeneAmp PCR System 9600、パーキン＝エルマー社製) を使用して実施した。

実施例1 Pfu DNAポリメラーゼIIの調製

Pfu DNAポリメラーゼIIをコードする遺伝子を含有するプラスミドpFU1001で形質転換された大腸菌JM109、Escherichia coli JM109/pFU1001 (FERM BP-5579) を培養して得られる菌体よりPfu DNAポリメラーゼIIを精製し、以下の操作に使用した。なお、形質転換体の培養および酵素の精製は、国際公開第97/24444号パンフレット（例えば、28～29頁、実施例3等）に記載の方法にしたがって行なった。

なお、上記のPfu DNAポリメラーゼIIの酵素活性は以下の方法で測定した。基質には仔牛胸腺DNA（ワージントン社製）を活性化したもの（活性化

DNA) を用いた。DNAの活性化およびDNAポリメラーゼ活性の測定は、ハーパー アンド ロー社発行、D. R. デービス (D. R. Davis) 編集のDNAポリメラーゼ フロム エシェリヒア コリ (DNA polymerase from Escherichia coli) 第263 ~276 頁 (C. C. リチャードソン著) に記載の方法で行なった。活性を測定しようとする試料 5 μ l に反応液 [20 mM トリス-塩酸 (pH 9.0)、15 mM 塩化マグネシウム、2 mM 2-メルカプトエタノール、0.2 mg/ml 活性化DNA、それぞれ 40 μ M の dATP、dCTP、dGTP および dTTP、60 nM [3 H] dTTP (アマシャム社製)] 45 μ l を添加し、75°Cで5分間反応させた。そのうちの 40 μ l をDEペーパー (ワットマン社製) にスポットし、5重量% Na_2HPO_4 で洗浄を5回行なった後にDEペーパー上に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した。上記の酵素活性測定方法によって30分間あたりに 10 nmol の [3 H] dTMP を基質DNAに取り込む酵素量を酵素 1 U とした。

実施例 2 プライマーの作製

λ DNAの塩基配列をもとにして λ 1 ~ λ 5、 λ 7 ~ λ 10、 λ L 3 6 および λ R 4 8 5 の 11 種類のプライマーを合成した。プライマー λ 1 ~ λ 5、 λ 8 ~ λ 10 の塩基配列をそれぞれ配列表の配列番号 : 3 ~ 10 に示す。また、 λ 7 の塩基配列を配列表の配列番号 : 11 に示す。さらに λ L 3 6 および λ R 4 8 5 の塩基配列をそれぞれ配列表の配列番号 : 12 ~ 13 に示す。これらのプライマーの組み合わせによって λ DNAを錆型としたPCRで増幅される増幅DNA断片の鎖長を表1に示す。さらに大腸菌ゲノムの塩基配列をもとに Eco 1、Eco 2 および Eco 5 の 3 種類のプライマーを合成した。Eco 1、Eco 2 および Eco 5 の塩基配列をそれぞれ配列表の配列番号 : 14 ~ 16 に示す。これらのプライマーの組み合わせによって大腸菌ゲノムDNAを錆型としたPCRで増幅される増幅DNA断片の鎖長を表1に示す。さらにヒト Apo E 領域の塩基配列をも

とにApoE-1およびApoE-2の2種類のプライマーを合成した。ApoE-1およびApoE-2の塩基配列をそれぞれ配列表の配列番号：17～18に示す。これらのプライマーの組み合わせによってヒトゲノムDNAを鑄型としたPCRで増幅される増幅DNA断片の鎖長を表1に示す。

表1

プライマー対	増幅DNA断片の鎖長(kb)
λ1 / λ2	0.5
λ1 / λ3	1
λ1 / λ4	2
λ1 / λ5	4
λ1 / λ7	8
λ1 / λ8	10
λ1 / λ9	12
λ1 / λ10	15
λL36 / λR485	48.5
Eco1 / Eco2	2
Eco1 / Eco5	10
ApoE-1 / ApoE-2	0.44

実施例3 酸性物質によるDNA合成反応の促進

(1) Pfu DNAポリメラーゼIIの活性への影響

酸性物質として国際公開第97/26896パンフレットに記載の方法（例えば、実施例7、第77頁8行～第78頁13行および実施例9、第79頁7行～18行等）で得られたフコース硫酸含有多糖-F、仔牛胸腺DNA（ワージントン社製）、ヘパリン（和光純薬社製）を使用し、これらがPfu DNAポリメラーゼIIの活性に与える影響を調べた。

鑄型としてλDNA、プライマー対としてプライマーλ1およびλ3、DNAポリメラーゼとしてPfu DNAポリメラーゼIIを含む反応液を調製し、PCRを行なった。反応液の組成を以下に示す。

反応液組成：

10 mMトリス-塩酸(pH9.2)、75 mM 塩化カリウム、6 mM 塩化

マグネシウム、それぞれ0.4 mMのdATP、dCTP、dGTPおよびdTTP、0.01% BSA、1.25 UのPfu DNAポリメラーゼII、500 pgのλDNA、ならびに5 pmolずつのプライマーλ1およびλ3（最終容量は25 μl）。

さらに前記反応液中に、それぞれ5 ngのフコース硫酸含有多糖-F、200 ngの仔牛胸腺DNAまたは0.5 ng、1 ng、2 ng、5 ngのヘパリンを添加した。

反応は98°C、0秒～68°C、0秒を1サイクルとした25サイクルで行なった。なお、本明細書においては、「98°C、0秒」、「68°C、0秒」などの記載は、温度が設定された温度に達したと同時に次の設定温度への以降が起こるよう反応装置をプログラムしたこと示す。

反応終了後、得られた各反応液5 μlを0.00005%のエチジウムプロマイドを含む1%アガロースゲルにて電気泳動し、泳動後のゲルに紫外線照射し増幅産物に由来するバンドを可視化することにより、増幅断片を確認した。その結果、どの酸性物質を添加した場合でも予想される1 kbの断片が良好に増幅されていることが確認された。0.5 ngのヘパリンを添加した場合は特に効率良く増幅されていた。一方、酸性物質を添加していない同様の反応液について上記の反応条件でPCRを実施したところ、1 kbの増幅断片は確認できなかった。

さらに、長鎖長のDNAの増幅について検討をおこなった。鋳型のλDNA量を2.5 ngに、またプライマー対をプライマーλ1およびλ5あるいはプライマーλ1およびλ10のそれぞれに変更した他は上記と同様のPCR反応液を調製した。なお、酸性物質としては200 ngの仔牛胸腺DNAまたは5 ngのフコース硫酸含有多糖-Fを添加した。反応は、98°C、0秒～68°C、5分を1サイクルとした30サイクルで行なった。その結果、仔牛胸腺DNAまたはフコース硫酸含有多糖-Fを添加した場合には、プライマーλ1およびλ5では4 kb、またプライマーλ1およびλ10では15 kbの増幅断片がそれぞれ確認さ

れた。一方、これらの酸性物質を添加していないものではどちらのプライマー対でも増幅断片は確認できなかった。

(2) Pfu DNAポリメラーゼIのDNA合成反応への影響

酸性物質であるフコース硫酸含有多糖-FがPfu DNAポリメラーゼIの活性に与える影響を調べた。なお、Pfu DNAポリメラーゼIには組換えDNA技術を利用して調製された酵素(Cloned Pfu DNA Polymerase、ストラタジーン社製)を使用した。

鋳型としてλDNA、プライマー対としてプライマーλ1およびλ2、DNAポリメラーゼとしてPfu DNAポリメラーゼIを含む反応液を調製し、PCRを行なった。反応液の組成を以下に示す。

反応液組成：

Pfu DNAポリメラーゼI用緩衝液(ストラタジーン社製)、それぞれ0.2 mMのdATP、dCTP、dTTPおよびdGTP、1.25 UのPfu DNAポリメラーゼI、500 pgの鋳型DNA、5 pmolずつのプライマーλ1およびλ2(最終容量は25 μl)。この反応液に20 ngのフコース硫酸含有多糖-Fを添加したもの、添加しないものの2種の反応液を調製した。

調製した反応液について94°C、30秒～55°C、30秒～72°C、60秒を1サイクルとした25サイクルの反応を行なった後、反応液5 μlを1%アガロースゲルにて電気泳動して、増幅DNA断片を確認した。増幅された0.5 kbのDNA断片の量を前記の方法で可視化して比較したところ、フコース硫酸含有多糖-Fを添加した反応液中のDNA増幅量の方が多いことが判明した。このことから、フコース硫酸含有多糖-Fの添加によりPfu DNAポリメラーゼIによるDNA増幅効率が向上することが確認された。

実施例4 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する2種のDNAポリメラーゼを使用したPCR

共に3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼであるPfu DNAポリメラーゼIIとPfu DNAポリメラーゼIの両者を同時に使用したPCRについて検討を行なった。なお、Pfu DNAポリメラーゼIには上記の Cloned Pfu DNA Polymerase (ストラタジーン社製) を使用した。

(1) Pfu DNAポリメラーゼI、Pfu DNAポリメラーゼIIを混合して使用するPCR

鋳型としてλDNA、プライマー対としてプライマーλ1およびλ8を含む反応液を調製し、PCRを行なった。このPCRにはPfu DNAポリメラーゼIおよびPfu DNAポリメラーゼIIの両者を使用した。反応液の組成を以下に示す。

反応液組成：

10 mMトリスー塩酸(pH 9.2)、75 mM 塩化カリウム、6 mM 塩化マグネシウム、それぞれ0.4 mMのdATP、dTTP、dGTPおよびdTTP、0.01% BSA、500 pgの鋳型DNA、5 pmolずつのプライマーλ1およびλ8。

前記反応液に0.375 UのPfu DNAポリメラーゼIIおよび0.125、0.375、0.75、1.25 UのPfu DNAポリメラーゼIをそれぞれ添加し、反応液の最終容量は25 μlとした。また対照として、Pfu DNAポリメラーゼIのみを添加した反応液、Pfu DNAポリメラーゼIIのみを添加した反応液も準備した。

これらの反応液について98°C、0秒～68°C、3分を1サイクルとした25サイクルの反応を行なった後、反応液5 μlを0.00005%エチジウムプロマイドを含む1%アガロースゲルにて電気泳動して、増幅DNA断片を確認した。その結果、Pfu DNAポリメラーゼIのみでは、その添加量にかかわらず10 kbのDNA断片の増幅は確認されなかった。またPfu DNAポリメラーゼIIのみではごくわずかな10 kb断片が認められたが、Pfu DNAポ

リメラーゼ I I に P f u DNA ポリメラーゼ I を添加することによりその添加量依存的に 10 kb 断片の増幅効率が向上していることが確認された。

(2) 鎮長の異なるDNA断片の増幅

錆型として λ DNA、プライマー対としてプライマー λ 1 および λ 3、プライマー λ 1 および λ 4 あるいはプライマー λ 1 および λ 5 のそれぞれを使用し、以下に示す組成の反応液を調製した。

反応液組成：

10 mM トリス-塩酸 (pH 9.2)、75 mM 塩化カリウム、6 mM 塩化マグネシウム、それぞれ 0.4 mM の dATP、dCTP、dTTP および dTTP、0.01% BSA、1.25 U の P f u DNA ポリメラーゼ I および 1.25 U の P f u DNA ポリメラーゼ I I 、500 pg の λ DNA、5 pmol ずつの各プライマー、5 ng または 50 ng のフコース硫酸含有多糖-F (最終容量は 25 μ l)。また、対照として、フコース硫酸含有多糖-F 無添加のものも調製した。

各反応液について 98 °C、0 秒～68 °C、0 秒を 1 サイクルとした 30 サイクルの反応を行なった。反応終了後、得られた各反応液 5 μ l を 0.00005% エチジウムプロマイドを含む 1% アガロースゲルにて電気泳動し、増幅断片を確認した。その結果、使用したプライマー対に応じて 1 kb、2 kb、4 kb の DNA 断片が増幅されていることが確認された。フコース硫酸含有多糖-F に関しては 50 ng を添加したものの方が 5 ng に比べて良好な増幅効率を示した。一方、無添加の場合は、増幅断片は確認できなかった。

実施例 5 従来の PCR 技術との比較

(1) 長鎖DNAの増幅

λ DNA を錆型とした 10 ～ 15 kb の DNA 断片の増幅反応について、実施例 4 の (2) に記載の反応系と 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する DN

Aポリメラーゼと該活性を有しないDNAポリメラーゼとの組み合わせからなるLA-PCR法との比較を行なった。なお、LA-PCR反応液はTakara LA PCR キット Ver. 2（宝酒造社製）を用いて調製した。

プライマー対としてプライマー λ 1および λ 8、プライマー λ 1および λ 9あるいはプライマー λ 1および λ 10のそれぞれを使用し、以下に示す組成の反応液を調製した。

反応液組成：

10 mMトリス-塩酸(pH 9.2)、75 mM 塩化カリウム、6 mM 塩化マグネシウム、それぞれ0.4 mMのdATP、dTTP、dGTPおよびdTTP、0.01% BSA、1.25 UのPfu DNAポリメラーゼIおよび1.25 UのPfu DNAポリメラーゼII、500 pgの λ DNA、5 pmolずつの各プライマー、50 ngのフコース硫酸含有多糖-F（最終容量は25 μ l）。

また、上記反応液同様の錆型DNA量、プライマー量としたLA-PCR反応液（最終容量は25 μ l）を上記のTakara LA PCR キット Ver. 2を用いて調製した。

これらの反応液について98°C、0秒～68°C、3分を1サイクルとした25サイクルの反応を行なった後、反応液5 μ lを0.00005%エチジウムプロマイドを含む1%アガロースゲルにて電気泳動し、增幅断片を確認した。その結果、実施例5の(2)に記載のPfu DNAポリメラーゼIおよびPfu DNAポリメラーゼIIの組み合わせでは、各プライマー対に対してそれぞれ10 kb、12 kbおよび15 kbのDNA断片の増幅が確認された。

一方、従来のLA-PCRを使用した反応では10 kb断片の増幅は確認されたが、12 kbおよび15 kbの断片の増幅は認められなかった。

なお、1サイクルの条件を98°C、0秒～68°C、5分に変更して12 kb断片の増幅を試みたところ、この場合にはLA-PCR反応液においても増幅が認

められた。

(2) 短鎖DNAの短時間反応による增幅

λ DNAを鑄型とした0. 5～4 kbのDNA断片の増幅反応について、実施例4の(2)に記載の反応系とLA-PCR法、ならびにDNA合成速度が高いことが知られているKOD DNAポリメラーゼの比較を行なった。なお、LA-PCR反応液は上記のTaKaRa LA PCR キット Ver. 2を用いて、また、KOD DNAポリメラーゼ反応液は東洋紡社製のKOD DNAポリメラーゼと添付の反応用緩衝液を用いてそれぞれ調製した。

プライマー対としてプライマー λ 1および λ 2、プライマー λ 1および λ 3あるいはプライマー λ 1および λ 5のそれぞれを使用し、以下に示す組成の反応液を調製した。

反応液組成：

1.0 mMトリス-塩酸(pH 9.2)、7.5 mM 塩化カリウム、6 mM 塩化マグネシウム、それぞれ0.4 mMのdATP、dTTP、dGTPおよびdTTP、0.01% BSA、1.25 UのPfu DNAポリメラーゼIおよび1.25 UのPfu DNAポリメラーゼII、500 pgの λ DNA、5 pmolずつの各プライマー、50 ngのフコース硫酸含有多糖-F（最終容量は25 μ l）。

また、上記反応液同様のプライマー対を用いたLA-PCR反応液、KOD DNAポリメラーゼ反応液（ともに最終容量は25 μ l）を調製した。ただし、この2種の反応液については鑄型である λ DNAを2500 pgづつ加えた。

これらの各反応液について98°C、0秒～68°C、0秒を1サイクルとした25サイクルの反応を行なった後、反応液5 μ lを0.00005%エチジウムブロマイドを含む1%アガロースゲルにて電気泳動し、増幅断片を確認した。その結果、Pfu DNAポリメラーゼIおよびPfu DNAポリメラーゼIIの組み合わせでは、各プライマー対に対してそれぞれ0.5 kb、1 kbおよび4

k b のDNA断片の増幅が確認された。

これに対して、従来のLA-PCR反応液、KOD DNAポリメラーゼ反応液では、5倍量の鑄型DNAを含むにもかかわらず0.5 k b のDNA断片のみが微弱に増幅されているのが認められたに過ぎなかった。

(3) DNA検出感度の比較

微量のλDNAを鑄型としたDNA断片の増幅反応について、実施例4の(2)に記載の反応系とLA-PCR法の比較を行なった。なお、LA-PCR反応液は上記のTakara LA PCR キット Ver. 2を用いて調製した。

プライマー対としてプライマーλ1およびλ2を使用し、以下に示す組成の反応液を調製した。

反応液組成：

1.0 mMトリス-塩酸(pH 9.2)、7.5 mM 塩化カリウム、6 mM 塩化マグネシウム、それぞれ0.4 mMのdATP、dCTP、dTTPおよびdTTP、0.01% BSA、1.25 UのPfu DNAポリメラーゼIおよび1.25 UのPfu DNAポリメラーゼII、0.05 fgのλDNA、5 pmolずつの各プライマー、ならびに50 ngのフコース硫酸含有多糖-F(最終容量は25 μl)。

また、上記反応液同様の鑄型DNA量、プライマー量のLA-PCR反応液を調製した。

この両反応液について98°C、0秒～68°C、0秒を1サイクルとした50サイクルの反応を行なった後、反応液5 μlを0.00005%エチジウムプロマイドを含む1%アガロースゲルにて電気泳動し、増幅断片を確認した。その結果、実施例4の(2)記載の反応系でのみ0.5 k b のDNA断片の増幅が認められた。

次に、プライマー対をプライマーλ1およびλ8に変更し、上記同様に2種の

反応液を調製した。両反応液について 98°C、0 秒～68°C、3 分を 1 サイクルとした 50 サイクルの反応を行なった後、反応液 5 μl を 0.00005% エチジウムプロマイドを含む 1% アガロースゲルにて電気泳動し、増幅断片を確認した。その結果、実施例 4 の（2）記載の反応系では 10 kb の DNA 断片の増幅が認められたのに対し、従来の L A - P C R 反応液では DNA 断片の増幅は認められなかった。

実施例 6 热水抽出によるフコース硫酸含有多糖-F の調製

以下の実施例において使用されたフコース硫酸含有多糖-F は、すべて下記の方法で精製されたものである。以下にフコース硫酸含有多糖-F の調製例を示す。

ガゴメ昆布を充分乾燥後、乾燥重量 20 kg のガゴメ昆布を粉碎し、得られた乾燥粉末を 7.3 kg の塩化カルシウム・2 水和物を含む 900 リットルの水道水に懸濁し、攪拌しながら 40 分かけて 90°C まで昇温し、90°C～95°C に保持して 1 時間抽出を行なった。その後、20°C まで冷却し、攪拌を止めて、一晩放置し、抽出物を得た。

次に遠心分離機（ウェストファリアセパレーター社製 CNA 型）を用いて固液分離を行なった。上記抽出物を遠心分離機により、固液分離上清液を約 900 リットル得た。その内の 360 リットルを 3 ミクロンサイズのフィルター（日本食品濾材社製）を組込んだスパクラフィルター（日本染色機械社製）にてろ過した。ろ過液は、分画分子量 3 万の UF 膜（FE 10-F C-F US 0382、ダイセル化学工業社製）にて 20 リットルまで濃縮した後、水道水を 20 リットル加えて、再度 20 リットルまで濃縮した。上記のように希釈濃縮操作を 5 回繰返した後、約 25 リットルの濃縮液を得た。

上記濃縮液 700 ml に最終濃度が 0.2 M 塩化カルシウム、20 mM 酢酸ナトリウムになるように添加した後、0.2 M 塩化カルシウムを含む、20 mM 酢

酸ナトリウム平衡化バッファー（pH 6.0）にて透析した。透析処理後の溶液を上記平衡化バッファー10リットルで平衡化した3500mlのDEAE-セファロースFFカラム（カラム内径：9.7cm）にかけ、5リットルの平衡化バッファーで洗浄した。次に下記に示した3段階のグラジエント条件で溶出を行なった。

なお、クロマトグラフィーの流速は、3500ml／1時間に設定した。グラジエント条件：

1) 0～0.5M 塩化ナトリウムのリニアグラジエント

（溶出液量：4.5リットル）

2) 0.5～1.0M 塩化ナトリウムのリニアグラジエント

（溶出液量：4.5リットル）

3) 1.0～2.0M 塩化ナトリウムのリニアグラジエント

（溶出液量：4.5リットル）

溶出液は、1フラクション当たり250mlずつ集めた。各フラクションについて、フェノール硫酸法で糖定量、カルバゾール硫酸法でウロン酸定量を行なった。その結果、糖含有量が高く、ウロン酸の量が低いフラクションであるフラクションNo. 40～53の画分を得た。フラクションNo. 40～53の画分をフコース硫酸含有多糖-F画分と称す。フコース硫酸含有多糖-F画分を10万の限外ろ過膜にて濃縮後、50mMクエン酸ナトリウムにて透析を行ない、さらに蒸留水にて一晩透析した。引き続き、凍結乾燥を行ない、フコース硫酸含有多糖-F画分より1.696gのフコース硫酸含有多糖-Fを得た。

実施例7 热水抽出によるフコース硫酸含有多糖-Uの调製

以下の実施例において使用されたフコース硫酸含有多糖-Uは、すべて下記の方法で精製されたものである。以下にフコース硫酸含有多糖-Uの調製例を示す。

ガゴメ昆布の2tを粉碎し、得られた乾燥粉末を730kgの塩化カルシウム・2水和物を含む4.4キロリットルの水道水に懸濁し、攪拌しながら1時間35分かけて95°Cまで昇温し、95°Cで2時間保持して抽出を行なった。その後、一晩かけて室温まで冷却した。

次にデカンタ（タナベウィルテック社製）により固液分離を行なった。運転条件は、3000～3300 rpm (2560G) で約8時間かけて行なった。得られた固液分離上清液は、分画分子量3万のUF膜(FE10-FC-FUSO382、ダイセル化学工業社製)にて5キロリットルまで濃縮した後、さらにUF脱塩を行なった。

上記脱塩液をアドバンテック#327のろ紙(アドバンテック社製)を組込んだリンターフィルター(内外醸機社製)で濁り除去を行なった。濾過液は、プレートヒーター(日阪製作所社製)にて98°Cで40秒間殺菌した。得られた抽出液は、約4620リットルであった。該抽出液の一部を凍結乾燥機(共和真空技術社製)にて凍結乾燥した。

該凍結乾燥物340gを0.2M塩化カルシウムを含む、20mM酢酸ナトリウム平衡化バッファー(pH 6.0)21.2リットルに溶解した。該溶液を平衡化バッファーで平衡化した約35リットルのDEAE-セファロースFFカラム(カラム内径: 3.5cm)にかけ、70リットルの平衡化バッファーで洗浄した。次に下記に示した3段階のグラジェント条件で溶出を行なった。

なお、クロマトグラフィーの流速は、35リットル/1時間に設定した。グラジェント条件:

1) 0～0.5M 塩化ナトリウムのリニアグラジェント

(溶出液量: 120リットル)

2) 0.5～1.0M 塩化ナトリウムのリニアグラジェント

(溶出液量: 120リットル)

3) 1.0～1.5M 塩化ナトリウムのリニアグラジェント

(溶出液量：120リットル)

溶出液は、1フラクション当たり10リットルずつ集めた。各フラクションについて、フェノール硫酸法で糖定量、カルバゾール硫酸法でウロン酸の定量を行なった。その結果、糖含有量およびウロン酸量が高いフラクションNo. 4～16の画分を得た。フラクションNo. 4～16の画分をフコース硫酸含有多糖-U画分と称す。フコース硫酸含有多糖-U画分を分子量1万カットの限外ろ過膜にて濃縮後、分子量12000～14000カットのセルロースチューブを用いて透析を行なった。まず、50mMクエン酸3ナトリウム2水和物水溶液にて3～4時間おきに該溶液を交換する操作を2回行なった後、さらに該溶液にて一晩透析した。次に蒸留水にて3～4時間おきに蒸留水を交換する操作を2回行なった後、さらに蒸留水にて一晩透析した。引き続き、凍結乾燥を行ない、フコース硫酸含有多糖-U画分より37.6gのフコース硫酸含有多糖-Uを得た。

実施例8 酸性物質によるPfu DNAポリメラーゼIIのDNA合成反応の促進

以下の実施例においてPCRは、タカラPCRサーマルサイクラーパーソナル（宝酒造社製）を使用してfastモードで実施した。

(1) フコース硫酸含有多糖-F、デキストラン硫酸パウダーおよびアルギン酸ナトリウムのPfu DNAポリメラーゼII活性への影響

上記実施例6で得られたフコース硫酸含有多糖-F、デキストラン硫酸パウダー（オンコー社製）、アルギン酸ナトリウム（100～150センチポアズ、和光純薬社製）を使用し、これらがPfu DNAポリメラーゼIIの活性に与える影響を調べた。鑄型としてλDNA、プライマー対としてプライマーハ1およびハ2、DNAポリメラーゼとしてPfu DNAポリメラーゼIIを含む反応液を調製し、PCRを行なった。反応液組成を以下に示す。

反応液組成：

10 mMトリス-塩酸、pH 9.2、75 mM 塩化カリウム、6 mM 塩化マグネシウム、それぞれ0.4 mMのdATP、dTTP、dGTPおよびdTTP、0.01% BSA、1.25 UのPfu DNAポリメラーゼII、100 pgのλDNA、ならびに5 pmolずつのプライマーλ1およびλ2（最終容量は25 μl）。さらに前記反応液中に、それぞれ10 ngのフコース硫酸含有多糖-F、10 ngのデキストラン硫酸パウダーまたは1 μgのアルギン酸ナトリウムを添加した。

これらの反応液について98 °C、5秒～66 °C、15秒を1サイクルとした25サイクルの反応を行なった後、反応液5 μlを0.00005%エチジウムブロマイドを含む1%アガロースゲルにて電気泳動し、增幅断片を確認した。その結果を表2に示す。

表2

酸性物質	添加量	増幅結果
フコース硫酸含有多糖-F	10 ng	++
デキストラン硫酸パウダー	10 ng	+
アルギン酸ナトリウム	1 μg	+
無添加		-

++ : 強い増幅が見られる

+ : 増幅が見られる

± : わずかな増幅が見られる

- : 増幅は見られない

表2に示されるようにどの酸性物質を添加した場合でも予想される0.5 kbの断片が良好に増幅されていることが確認された。一方、酸性物質を添加していない同様の反応液について上記の反応条件でPCRを実施したところ、0.5 kbの増幅断片は確認できなかった。

(2) フコース硫酸含有多糖-F、フコース硫酸含有多糖-Uおよびポリグルタミン酸ナトリウムのPfu DNAポリメラーゼIIのDNA合成反応への影響
さらに、酸性物質として上記実施例6で得られたフコース硫酸含有多糖-F、

上記実施例 7 で得られたフコース硫酸含有多糖-U、ポリグルタミン酸ナトリウム（シゲマ社製）の効果について検討を行なった。鋳型の λ DNA 量を 500 pg に、またプライマー対をプライマー λ 1 および λ 3 に変更した他は上記と同様の PCR 反応液を調製した。前記反応液に 5 ng のフコース硫酸含有多糖-F、それぞれ 5 ng、10 ng、20 ng および 30 ng のフコース硫酸含有多糖-U、それぞれ 250 ng、500 ng、750 ng および 1000 ng のポリグルタミン酸ナトリウムをそれぞれ添加した。

反応は、98 °C、5 秒～66 °C、15 秒を 1 サイクルとした 30 サイクルで行なった。反応終了後、得られた各反応液 5 μ l を 0.00005% エチジウムブロマイドを含む 1% アガロースゲルにて電気泳動し、增幅断片を確認した。その結果を表 3 に示す。

表 3

酸性物質	添加量 (ng)	増幅結果
フコース硫酸含有多糖-F	5	++
フコース硫酸含有多糖-U	5	++
	10	+
	20	+
	30	±
ポリグルタミン酸ナトリウム	250	+
	500	+
	750	++
	1000	++
無添加		-

++ : 強い増幅が見られる

+ : 増幅が見られる

± : わずかな増幅が見られる

- : 増幅は見られない

表 3 に示されるように、フコース硫酸含有多糖-F、フコース硫酸含有多糖-U またはポリグルタミン酸ナトリウムを添加した場合には、いずれにおいても 1 kb の増幅断片が確認された。一方、これらの酸性物質を添加していないものは 1 kb の増幅断片は確認できなかった。

実施例 9 酸性物質によるTaq DNAポリメラーゼのDNA合成反応の促進

上記実施例6で得られたフコース硫酸含有多糖-F、またはアルギン酸ナトリウムを使用し、これらがタカラTaq DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）に与える影響を調べた。本実施例においてPCRは、タカラPCRサーマルサイクルーパーソナルを使用してノーマルモードで実施した。

鋳型として λ DNA、プライマー対としてプライマー λ 1および λ 3、DNAポリメラーゼとしてタカラTaq DNAポリメラーゼを含む反応液を調製し、PCRを行なった。反応液組成を以下に示す。

反応液組成：

タカラTaq DNAポリメラーゼ用緩衝液、それぞれ0.2mMのdATP、dCTP、dTTPおよびdGTP、ならびに1.25UのタカラTaq DNAポリメラーゼ、100pgの λ DNA、ならびに10pmolずつのプライマー λ 1および λ 3（最終容量は50μl）。さらに前記反応液中に、それぞれ0.1ngおよび0.25ngのフコース硫酸含有多糖-F、または1μgのアルギン酸ナトリウムを添加した。

反応は98°C、10秒～68°C、1分を1サイクルとした30サイクルで行なった。反応終了後、得られた各反応液5μlを0.00005%エチジウムブロマイドを含む1%アガロースゲルにて電気泳動し、增幅断片を確認した。その結果を表4に示す。

表 4

酸性物質	添加量	増幅結果
フコース硫酸含有多糖-F	0. 1 n g	++
	0. 25 n g	++
アルギン酸ナトリウム	1 μ g	+
無添加		-

++ : 強い増幅が見られる
 + : 増幅が見られる
 ± : わずかな増幅が見られる
 - : 増幅は見られない

表 4 に示されるようにどの酸性物質を添加した場合でも予想される 1 kb の断片が良好に増幅されていることが確認された。一方、酸性物質を添加していない同様の反応液について上記の反応条件で PCR を実施したところ、1 kb の増幅断片は確認されなかった。

実施例 10 LA-PCR 用 DNA ポリメラーゼに対する酸性物質の影響

(1) 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する DNA ポリメラーゼと該活性を有しない DNA ポリメラーゼの組合せからなる LA-PCR 法において酸性物質の影響を検討した。錆型として λ DNA 、プライマー対としてプライマー λ 1 および λ 8 を含む反応液を調製し、 PCR を行なった。この PCR にはタカラ EX-Taq DNA ポリメラーゼ（宝酒造社製）を使用した。反応液の組成を以下に示す。

なお、以下の実施例において PCR は、タカラ PCR サーマルサイクラーパーソナル（宝酒造社製）を使用して fast モードで実施した。

反応液組成：

タカラ EX-Taq DNA ポリメラーゼ用緩衝液、それぞれ 0. 2 mM の d A TP 、 d CTP 、 d GTP および d TTP 、 10 pg の λ DNA 、 1. 25 U のタカラ EX-Taq DNA ポリメラーゼならびに 10 pmol ずつのプライマ

一 λ 1 および λ 8 を含む反応液（最終容量は 50 μ l）。さらに前記反応液中に、それぞれ 1 ng のフコース硫酸含有多糖-F または 0.5 μ g のアルギン酸ナトリウムを添加した。

反応は、98 °C、5 秒～68 °C、3 分を 1 サイクルとした 27 サイクルで行なった。反応終了後、得られた各反応液 5 μ l を 0.00005% エチジウムブロマイドを含む 1% アガロースゲルにて電気泳動し、增幅断片を確認した。その結果を表 5 に示す。

さらに、100 pg の λ DNA を鋳型DNA とし、酸性物質として 0.25 μ g のアルギン酸ナトリウムまたは 1 ng のフコース硫酸含有多糖-F を添加したことを除いて、前記反応液組成と同じ反応液について、PCRを行なった。

反応は、98 °C、5 秒～68 °C、3 分を 1 サイクルとした 29 サイクルで行なった。反応終了後、得られた各反応液 5 μ l を 0.00005% エチジウムブロマイドを含む 1% アガロースゲルにて電気泳動し、增幅断片を確認した。その結果についても表 5 に示す。

表 5

鋳型DNA量	酸性物質	添加量	増幅結果
10 pg	フコース硫酸含有多糖-F	1 ng	++
	アルギン酸ナトリウム	0.5 μ g	++
	無添加	—	—
100 pg	フコース硫酸含有多糖-F	1 ng	++
	アルギン酸ナトリウム	0.25 μ g	++
	無添加	—	±

++ : 強い増幅が見られる

+ : 増幅が見られる

± : わずかな増幅が見られる

— : 増幅は見られない

表 5 に示されるように、いずれの鋳型DNA量においても、酸性物質を添加した場合には、予想される 10 kb の断片が良好に増幅されていることが確認された。一方、酸性物質を添加していない反応液について上記の反応条件で PCR を

実施したところ、鑄型DNAが100 pgの場合において、10 kbの増幅断片が微弱ながら確認された。

(2) 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼと該活性を有しないDNAポリメラーゼの組合せからなるKOD dash DNAポリメラーゼ（東洋紡社製）において酸性物質の影響を検討した。鑄型としてλDNA、プライマー対としてプライマーλ1およびλ9を含む反応液を調製し、PCRを行なった。なお、以下の実施例においてPCRは、タカラPCRサーマルサイクーパーソナル（宝酒造社製）を使用してfastモードで実施した。反応液の組成を以下に示す。

反応液組成：

KOD dash DNAポリメラーゼ添付専用緩衝液、それぞれ0.2 mMのdATP、dCTP、dGTPおよびdTTP、10 pgのλDNA、2.5 UのKOD dash DNAポリメラーゼならびに10 pmolずつのプライマーλ1およびλ9を含む反応液（最終容量は50 μl）。さらに前記反応液中に、それぞれ1 ngのフコース硫酸含有多糖-Fまたは0.5 μgのアルギン酸ナトリウムを添加した。

反応は、98 °C、5秒～68 °C、3分を1サイクルとした25サイクルで行なった。反応終了後、得られた各反応液5 μlを0.00005%エチジウムブロマイドを含む1%アガロースゲルにて電気泳動し、増幅断片を確認した。その結果を表6に示す。

表 6

酸性物質	添加量	増幅結果
フコース硫酸含有多糖一F	1 n g	+
アルギン酸ナトリウム	0.5 μg	++
無添加		±

++ : 強い増幅が見られる
 + : 増幅が見られる
 ± : わずかな増幅が見られる
 - : 増幅は見られない

表 6 に示されるようにどの酸性物質を添加した場合でも予想される 12 kb の断片が良好に増幅されていることが確認された。一方、酸性物質を添加していない同様の反応液について上記の反応条件で PCR を実施したところ、12 kb の増幅断片は、微弱なものしか確認されなかった。

実施例 11 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する 2 種の DNA ポリメラーゼを使用した PCR

共に 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する DNA ポリメラーゼである Pfu DNA ポリメラーゼ II と KOD DNA ポリメラーゼ（東洋紡社製）、VENT DNA ポリメラーゼ（ニューイングランドバイオラボ社製）、DEEP VENT DNA ポリメラーゼ（ニューイングランドバイオラボ社製）のいずれかを同時に使用した PCR について検討を行なった。

鋳型として λ DNA、プライマー対としてプライマー λ 1 および λ 8 を含む反応液を調製し、PCR を行なった。この PCR には Pfu DNA ポリメラーゼ II と KOD DNA ポリメラーゼの組合せ、Pfu DNA ポリメラーゼ I と VENT DNA ポリメラーゼの組合せまたは Pfu DNA ポリメラーゼ II と DEEP VENT DNA ポリメラーゼの組合せをそれぞれ使用した。反応液の組成を以下に示す。

反応液組成：

10 mMトリスー塩酸(pH 9.2)、75 mM 塩化カリウム、6 mM 塩化マグネシウム、それぞれ0.4 mMのdATP、dTTP、dGTPおよびdTTP、0.01% BSA、500 pgのλDNAならびに5 pmolずつのプライマーリー1およびリ8。前記反応液に0.375 UのPfu DNAポリメラーゼIIおよび3.75 mUのKOD DNAポリメラーゼ、6.25 mUのVENT DNAポリメラーゼまたはDEEP VENT DNAポリメラーゼをそれぞれ添加し、反応液の最終容量は25 μlとした。

また対照として、Pfu DNAポリメラーゼII、KOD DNAポリメラーゼ、VENT DNAポリメラーゼまたはDEEP VENT DNAポリメラーゼのみを添加した反応液も準備した。これらの反応液について98°C、5秒～68°C、3分を1サイクルとした30サイクルの反応を行なった後、反応液5 μlを0.0005%エチジウムプロマイドを含む1%アガロースゲルにて電気泳動して、増幅DNA断片を確認した。その結果を表7に示す。

表7

DNAポリメラーゼの組合せ (ポリメラーゼA/ポリメラーゼB)	使用酵素量 (ポリメラーゼA/ポリメラーゼB)	増幅結果
Pfu DNA ポリメラーゼ II / -	0.375 U / -	±
- / KOD DNA ポリメラーゼ	- / 3.75 mU	-
- / VENT DNA ポリメラーゼ	- / 6.25 mU	-
- / DEEP VENT DNA ポリメラーゼ	- / 6.25 mU	-
Pfu DNA ポリメラーゼ II / KOD DNA ポリメラーゼ	0.375 U / 3.75 mU	+
Pfu DNA ポリメラーゼ II / VENT DNA ポリメラーゼ	0.375 U / 6.25 mU	+
Pfu DNA ポリメラーゼ II / DEEP VENT DNA ポリメラーゼ	0.375 U / 6.25 mU	+

++ : 強い増幅が見られる

+ : 増幅が見られる

± : わずかな増幅が見られる

- : 増幅は見られない

表7に示すように、KOD DNAポリメラーゼ、VENT DNAポリメラーゼまたはDEEP VENT DNAポリメラーゼのみでは10 kbの増幅断

片が認められなかつたが、Pfu DNAポリメラーゼIIのみでは、ごくわずかな10kbの増幅断片が認められた。さらに0.375UのPfu DNAポリメラーゼIIと3.75mUのKOD DNAポリメラーゼ、6.25mUのVENT DNAポリメラーゼまたはDEEP VENT DNAポリメラーゼを組合わせた系においては、Pfu DNAポリメラーゼIIのみの場合と比較して10kb断片の増幅効率が向上していることが確認された。

実施例12

実施例1で得られたPfu DNAポリメラーゼIIと α 型DNAポリメラーゼであるPfu DNAポリメラーゼI（ストラタジーン社製）、および酸性物質であるアルギン酸ナトリウムを組合わせてPCR反応を行なつた。

鋳型として λ DNA、プライマー対としてプライマー λ 1および λ 3を含む反応液を調製し、PCRを行なつた。反応液の組成を以下に示す。

反応液組成：

PCR反応バッファー（10mM トリス-塩酸、pH 9.2、75mM 塩化カリウム、6mM 塩化マグネシウム、それぞれ0.4mMのdATP、dTTP、dGTPおよびdTTP、0.01% BSA、0.004% アルギン酸ナトリウム）、10pgの λ DNAならびに5pmolずつのプライマー λ 1および λ 3。前記反応液に1.25UのPfu DNAポリメラーゼIIおよび1.14UのPfu DNAポリメラーゼIを含む酵素液を添加し、反応液の最終容量は25μlとした。

また、対照としてアルギン酸ナトリウム無添加の反応液も準備した。これらの反応液について98°C、5秒～66°C、15秒を1サイクルとした30サイクルの反応を行なつた後、反応液5μlを0.00005%エチジウムプロマイドを含む1%アガロースゲルにて電気泳動して、増幅DNA断片を確認した。その結果を表8に示す。

表 8

使用キットの種類	増幅結果
反応バッファー (0.004%アルギン酸ナトリウムを含む)	++
反応バッファー (アルギン酸ナトリウムを含まず)	-
++ : 強い増幅が見られる	
+ : 増幅が見られる	
± : わずかな増幅が見られる	
- : 增幅は見られない	

表 8 に示すように、*Pfu* DNAポリメラーゼ I、*Pfu* DNAポリメラーゼ II およびアルギン酸ナトリウムを組合わせた反応において 1 kb 断片の増幅効率が向上していることが確認された。さらに、市販の各粘度 (100~1000 センチポアズ) のアルギン酸ナトリウムについて上記の検討をしたところ全く同様のDNA合成の増幅効率の向上が確認された。

実施例 13 キットの調製

実施例 1 で得られた*Pfu* DNAポリメラーゼ II と *Pfu* DNAポリメラーゼ I、および酸性物質であるアルギン酸ナトリウムを組合わせて本発明のPCR 反応用のキット (20 回分) を構築した。

キット組成を以下に示す。

10 × PCR 反応バッファー	50 μl
100 mM トリス-塩酸 (pH 9.2)	
750 mM 塩化カリウム	
0.1% BSA	
0.04% アルギン酸ナトリウム (100~150 センチポアズ)	
25 mM 塩化マグネシウム溶液	120 μl
2.5 mM dNTP ミックス (各 2.5 mM の dATP、dCTP、dTTP	

およびd TTP)

80 μl

DNAポリメラーゼ酵素混合液(2.5U Pfu DNAポリメラーゼIIおよび2.28U Pfu DNAポリメラーゼI/1μl) 10 μl

上記のキットを用いてPCR反応液を調製した。錆型としてλDNAを使用した。表9に反応液組成を示す。

表9

反応液組成	
10×PCR反応バッファー	2.5 μl
塩化マグネシウム溶液	6 μl
dNTPミックス	4 μl
DNAポリメラーゼ酵素混合液	0.5 μl
λDNA	10 pg
λ1プライマー	5 pmol
λ3プライマー	5 pmol
滅菌蒸留水	残部
最終容量	25 μl

また、対照としてアルギン酸ナトリウムを含まないほかは上記と同じ組成の反応液を調製した。

上記反応液を実施例12に示したPCR条件で反応させた結果、上記アルギン酸ナトリウムを含むキットによって調製した反応液は、対照と比較して、1kb断片の増幅効率が向上していることが確認できた。

実施例14 酸性物質によるDNA合成反応の促進の数値化

実施例6で得られたフコース硫酸含有多糖-Fを使用して、Pfu DNAポ

リメラーゼ I I の活性への影響を調べた。鑄型として λ DNA、プライマー対としてプライマー λ 1 および λ 2、DNA ポリメラーゼとして Pfu DNA ポリメラーゼ I I を含む反応液を調製し、PCRを行なった。反応液組成を以下に示す。

反応液組成：

1.0 mM トリス-塩酸、pH 9.2、7.5 mM 塩化カリウム、6 mM 塩化マグネシウム、それぞれ 0.4 mM の dATP、dCTP、dGTP および dTT P、0.01% BSA、1.25 U の Pfu DNA ポリメラーゼ I I 、500 pg の λ DNA、ならびにそれぞれ 5 pmol ずつのプライマー λ 1 および λ 2（最終容量は 25 μ l）。さらに前記反応液中に、それぞれ 1.0 ng のフコース硫酸含有多糖-F を添加した。

これらの反応液について 98 °C、5 秒～66 °C、15 秒を 1 サイクルとした 30 サイクルの反応を行なった後、反応液 5 μ l を 0.00005% エチジウムブロマイドを含む 1% アガロースゲルにて電気泳動し、予想される 0.5 kb の增幅断片を確認した。また、そのアガロースゲルを蛍光イメージアナライザ FM-BIO（宝酒造社製）にて解析し、增幅断片の相対量を数値化した。

その結果、酸性物質を添加していない反応系を 1 とした場合に比較して酸性物質であるフコース硫酸含有多糖-F は、4.4 であった。即ち、PCRにおいて酸性物質を添加することにより増幅産物量は、4.4 倍になっていることが確認できた。

実施例 15 酸性物質による DNA 合成反応の促進

酸性物質であるポリアクリル酸を使用して、Pfu DNA ポリメラーゼ I I の活性への影響を調べた。鑄型として λ DNA、プライマー対としてプライマー λ 1 および λ 3、DNA ポリメラーゼとして Pfu DNA ポリメラーゼ I I を含む反応液を調製し、PCRを行なった。反応液組成を以下に示す。

反応液組成：

10 mMトリスー塩酸、pH 9.2、75 mM 塩化カリウム、6 mM 塩化マグネシウム、それぞれ0.4 mMのdATP、dTTP、dGTPおよびdTTP、0.01% BSA、1.25 UのPfu DNAポリメラーゼII、500 pgのλDNA、ならびにそれぞれ5 pmolずつのプライマーラー1およびラ3（最終容量は25 μl）。さらに前記反応液中に、平均分子量が、約5千、2万5千、25万、100万のポリアクリル酸（いずれも和光純薬社製）をそれぞれ100 ng添加した。

これらの反応液について98 °C、5秒～66 °C、15秒を1サイクルとした30サイクルの反応を行なった後、反応液5 μlを0.00005%エチジウムブロマイドを含む1%アガロースゲルにて電気泳動し、增幅断片を確認した。その結果を表10に示す。

表10

酸性物質	平均分子量	増幅結果
ポリアクリル酸ナトリウム	5,000	++
	25,000	++
	250,000	++
	1,000,000	++
無添加		-

++ : 強い増幅が見られる
 + : 増幅が見られる
 ± : わずかな増幅が見られる
 - : 増幅は見られない

表10に示すように、どの平均分子量のポリアクリル酸を添加した場合でも予想される1 kbの断片が良好に増幅されていることが確認された。一方、酸性物質を添加していない同様の反応液については、上記の反応条件でPCRを実施し

たところ、1 kbの増幅断片は確認できなかった。

実施例 16 α 型DNAポリメラーゼに対する酸性物質の効果

(1) アルギン酸ナトリウム、ヒアルロン酸ナトリウム(生化学工業社製)、 κ カラギーナン(シグマ社製)を使用し、これらの α 型DNAポリメラーゼへの影響を調べた。鑄型として λ DNA、プライマー対としてプライマー λ 1および λ 8、DNAポリメラーゼとしてKOD DNAポリメラーゼ(東洋紡社製)を含む反応液を調製し、PCRを行なった。反応液組成を以下に示す。

反応液組成：

KOD DNAポリメラーゼバッファーI(東洋紡社製)、それぞれ0.2 mMのdATP、dCTP、dTTPおよびdGTP、0.625 UのKOD DNAポリメラーゼ、100 pgの λ DNA、ならびに5 pmolずつのプライマー λ 1および λ 8(最終容量は25 μ l)。さらに前記反応液中に、それぞれ1 μ gまたは2.5 μ gのアルギン酸ナトリウム、0.1 μ gまたは0.5 μ gのヒアルロン酸ナトリウム、0.1 μ gまたは0.25 μ gの κ カラギーナンを添加した。

これらの反応液について98 °C、5秒～68 °C、3分を1サイクルとした30サイクルの反応を行なった後、得られた反応液5 μ lを0.00005%エチジウムプロマイドを含む1%アガロースゲルにて電気泳動し、増幅断片を確認した。その結果を表11に示す。

表 11

酸性物質	添加量 (μg)	増幅結果
アルギン酸ナトリウム	1	++
	2. 5	++
ヒアルロン酸ナトリウム	0. 1	+
	0. 5	+
κ カラギーナン	0. 1	+
	0. 25	+
無添加		±

++ : 強い増幅が見られる
 + : 増幅が見られる
 ± : わずかな増幅が見られる
 - : 増幅は見られない

表11に示されるように、どの酸性物質を添加した場合でも予想される 10 kb の断片が良好に増幅されていることが確認された。一方、酸性物質を添加していない同様の反応液について上記の反応条件でPCRを実施したところ、弱いながら 10 kb の増幅断片が確認できた。

(2) アルギン酸ナトリウム、 κ カラギーナン、ヘパラン硫酸ナトリウム(シグマ社製)、デルマタン硫酸ナトリウム(シグマ社製)、ポリビニル硫酸カリウム(ナカライテスク社製)およびポリスチレンスルホン酸ナトリウム(平均分子量: 5,400 および 35,000 の 2 種類、全てナカライテスク社製)についても前記(1)と同様に、 α 型DNAポリメラーゼへの影響を調べた。錆型として λ DNA、プライマー対としてプライマー λ 1 および λ 8、DNAポリメラーゼとして KOD DNA ポリメラーゼを含む反応液を調製し、PCRを行なった。反応液の組成を以下に示す。

反応液組成:

KOD DNAポリメラーゼバッファーII（東洋紡社製）、それぞれ0.2mMのdATP、dCTP、dGTPおよびdTTP、1.25UのKOD DNAポリメラーゼ、100pgのλDNA、ならびに10pmolずつのプライマー λ 1および λ 8（最終容量は50μl）。さらに前記反応液中に、それぞれ2.5μgまたは5μgのアルギン酸ナトリウム、0.25μgまたは0.5μgのκカラギーナン、125ng、250ngまたは375ngのデルマタン硫酸ナトリウム、500ngのヘパラン硫酸ナトリウム、10ngのポリビニル硫酸カリウム、2.5ngまたは5ngのポリスチレンスルホン酸ナトリウム（平均分子量：5,400）、および5ngのポリスチレンスルホン酸ナトリウム（平均分子量：35,000）を添加した。

これらの反応液について98°C、5秒～68°C、3分を1サイクルとした30サイクルの反応を行なった後、得られた反応液5μlを0.00005%エチジウムブロマイドを含む1%アガロースゲルにて電気泳動し、增幅断片を確認した。その結果を表12に示す。

表 1 2

酸性物質	添加量	増幅結果
アルギン酸ナトリウム	2. 5 μ g	++
	5 μ g	++
κ カラギーナン	0. 25 μ g	++
	0. 5 μ g	++
デルマタン硫酸ナトリウム	125 ng	+
	250 ng	+
	375 ng	+
ヘパラン硫酸ナトリウム	500 ng	+
ポリビニル硫酸カリウム	10 ng	+
ポリスチレン硫酸ナトリウム (平均分子量 : 5,400)	2. 5 ng	+
	5 ng	+
	5 ng	+
無添加		-

++ : 強い増幅が見られる

+ : 増幅が見られる

± : わずかな増幅が見られる

- : 増幅は見られない

表 1 2 に示されるようにどの酸性物質を添加した場合でも予想される 10 kb の断片が良好に増幅されていることが確認された。一方、酸性物質を添加していない同様の反応液について上記の反応条件で PCR を実施したところ、10 kb の増幅断片は確認できなかった。

実施例 1 7 陽イオン錯体の各種DNAポリメラーゼへの影響

陽イオン錯体であるヘキサンミンコバルト(III)塩化物($[Co(NH_3)_6]Cl_3$)（シグマ社製）、トリス（エチレンジアミン）コバルト(III)塩化物 ($[Co(C_2H_8N_2)_3]Cl_3$)（アルドリッヂ社製）、トリス（エチレンジアミン）ロジウム(III)3塩化物・3水和物 ($Rh(C_2H_8N_2)_3]Cl_3 \cdot 3H_2O$)（アルドリッヂ社製）を使用して、各種DNAポリメラーゼによる增幅反応に対する影響を調べた。DNAポリメラーゼは、タカラ Taq DNAポリメラーゼ（以下、Taq DNAポリメラーゼと称す、宝酒造社製）、Pyrobest DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）およびExTaq DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）を用いた。

鋳型として大腸菌JM109ゲノムDNA、プライマー対としてプライマーEco1およびEco2、DNAポリメラーゼを含む反応液を調製し、PCRを行なった。各酵素ごとの反応液の組成を以下に示す。

反応液組成：

1) Taq DNAポリメラーゼ反応系

5 μlの10×Taq PCRバッファー（宝酒造社製）、0.2 mMのdATP、dCTP、dGTPおよびdTTP、1.25 UのTaq DNAポリメラーゼ、100 pgの大腸菌JM109ゲノムDNA、ならびに10 pmolずつのプライマーEco1およびEco2（最終容量は50 μl）。

2) Pyrobest DNAポリメラーゼ反応系

5 μlの10倍濃度Pyrobestバッファー（宝酒造社製）、0.2 mMのdATP、dCTP、dGTPおよびdTTP、1.25 UのPyrobest DNAポリメラーゼ、100 pgの大腸菌JM109ゲノムDNA、ならびに10 pmolずつのプライマーEco1およびEco2（最終容量は50 μl）。

3) ExTaq DNAポリメラーゼ反応系

5 μlの10倍濃度タカラExTaq DNAポリメラーゼ用バッファー（宝酒造社製）、それぞれ0.2 mMのdATP、dCTP、dGTPおよびdTTP

P、100 pgの大腸菌JM109ゲノムDNA、1.25 UのタカラEX-Taq DNAポリメラーゼならびに10 pmolずつのプライマーEco1およびEco2を含む反応液（最終容量は50 μl）。

さらに前記反応液中に、それぞれ最終濃度50 μM、100 μM、200 μMとなるように上記錯体水溶液を添加した。

反応は、タカラPCRサーマルサイクルーパーソナル（宝酒造社製）を使用し、Fastモードで行なった。反応条件は、Taq DNAポリメラーゼおよびPyrobest DNAポリメラーゼについては、98°C、5秒～68°C、2分を1サイクルとした30サイクルで、ExTaq DNAポリメラーゼについては、98°C、5秒～68°C、1分を1サイクルとした30サイクルで行なった。反応終了後、得られた各反応液5 μlを0.00005%のエチジウムプロマイトを含む2%アガロースゲルにて電気泳動し、泳動後のゲルに紫外線照射し増幅産物に由来するバンドを可視化することにより、増幅断片を確認し、増幅されたDNA量を蛍光イメージアナライザーFM-BIOL00（宝酒造社製）にて数値化した。その結果を表13に示す。

表 1 3

陽イオン錯体	DNAポリメラーゼ		
	Taq	Pyrobest	ExTaq
[Co(NH ₃) ₆]Cl ₃			
50 μM	2. 3	2. 1	1. 9
100 μM	2. 9	2. 1	1. 9
200 μM	—	2. 1	—
[Co(H ₂ NCH ₂ CH ₂ NH ₂) ₃]Cl ₃			
50 μM	2. 6	2. 1	2. 0
100 μM	3. 0	2. 2	2. 0
200 μM	—	—	—
[Rh(H ₂ NCH ₂ CH ₂ NH ₂) ₃]Cl ₃			
50 μM	1. 4	1. 4	1. 3
100 μM	2. 1	1. 7	1. 5
200 μM	2. 5	2. 0	1. 7
無添加	1	1	1

その結果、Taq DNAポリメラーゼに関しては、50 μMおよび100 μMの塩化ヘキサンミンコバルト(III)、50 μMおよび100 μMのトリス(エチレンジアミン)コバルト(III)塩化物、50 μM、100 μMおよび200 μMのトリス(エチレンジアミン)ロジウム(III)3塩化物を添加した反応では、無添加の場合に比べて約1.4倍～約3倍のDNA增幅量の増加が確認された。

次に、Pyrobest DNAポリメラーゼに関しては、50 μM、100 μMおよび200 μMの塩化ヘキサンミンコバルト(III)、50 μMおよび100 μMのトリス(エチレンジアミン)コバルト(III)塩化物、50 μM、100 μMおよび200 μMのトリス(エチレンジアミン)ロジウム(III)3塩化物

を添加した反応では、無添加の場合に比べて約1.4倍～約2.2倍のDNA増幅量の増加が確認された。

さらに、ExTaq DNAポリメラーゼに関しては、50 μMおよび100 μMの塩化ヘキサアンミンコバルト(III)、50 μMおよび100 μMのトリス(エチレンジアミン)コバルト(III)塩化物、50 μM、100 μMおよび200 μMのトリス(エチレンジアミン)ロジウム(III)3塩化物を添加した反応では、無添加の場合に比べて約1.3倍～約2倍のDNA増幅量の増加が確認された。

実施例18 塩化ヘキサアンミンコバルト(III)添加による反応時間に対する影響

各DNAポリメラーゼに関して、塩化ヘキサアンミンコバルト(III)添加による反応時間の短縮効果について調べた。

使用するDNAポリメラーゼおよび反応液組成は、実施例17と同様にした。但し、陽イオン錯体に関しては、Taq DNAポリメラーゼおよびPyrobest DNAポリメラーゼは、最終濃度が100 μMの塩化ヘキサアンミンコバルト(III)、ExTaq DNAポリメラーゼは、最終濃度が50 μMの塩化ヘキサアンミンコバルト(III)になるようにそれぞれ添加した。

反応は、タカラPCRサーマルサイクラーパーソナルを使用し、Fastモードで行なった。反応条件は、Taq DNAポリメラーゼおよびPyrobest DNAポリメラーゼの場合は、98 °C、5秒～68 °C、60秒あるいは80秒あるいは100秒あるいは120秒を1サイクルとした30サイクルで、ExTaq DNAポリメラーゼの場合は、98 °C、5秒～68 °C、30秒あるいは40秒あるいは50秒あるいは60秒を1サイクルとした30サイクルで行なった。

一方、対照として上記陽イオン錯体無添加のものについても上記の反応と同量

の増幅産物量が得られるようにアニーリングおよび伸長反応の時間あるいはサイクル数を求めた。

反応終了後、得られた各反応液 5 μ l を 0.00005% のエチジウムプロマイトを含む 2% アガロースゲルにて電気泳動し、泳動後のゲルに紫外線照射し増幅産物に由来するバンドを可視化することにより、増幅断片を確認した。その結果を表 1 4 に示す。

表 1 4

DNA ポリメラーゼ	陽イオン錯体	
	添加	無添加
Taq 及び Pyrobest	98°C, 5秒～68°C, 60秒 30サイクル (所要時間: 2953秒)	98°C, 5秒～68°C, 120秒 31サイクル (所要時間: 4911秒)
ExTaq	98°C, 5秒～68°C, 40秒 30サイクル (所要時間: 2294秒)	98°C, 5秒～60°C, 60秒 30サイクル (所要時間: 2953秒)

表 1 4 に示したように、Taq DNA ポリメラーゼおよび Pyrobest DNA ポリメラーゼにおいては、100 μ M の塩化ヘキサアンミンコバルト(II)を添加した場合は、無添加の場合に比べ、約 3/5 に短縮できた。さらに ExTaq DNA ポリメラーゼにおいては、50 μ M の塩化ヘキサアンミンコバルト(III)を添加した場合は、無添加の場合に比べ、約 4/5 に短縮できた。

実施例 1 9 塩化ヘキサアンミンコバルト(III)添加による増幅感度への影響

各 DNA ポリメラーゼに関して、塩化ヘキサアンミンコバルト(III)添加による検出感度への影響について調べた。

使用する DNA ポリメラーゼおよび反応液組成は、実施例 1 7 と同様にした。

但し、陽イオン錯体に関しては、*Taq DNA*ポリメラーゼおよび*Pyrobest DNA*ポリメラーゼは、最終濃度が $100\mu M$ の塩化ヘキサンミンコバルト(III)、*ExTaq DNA*ポリメラーゼは、最終濃度が $50\mu M$ の塩化ヘキサンミンコバルト(III)になるようにそれぞれ添加した。さらに、鑄型DNA量は、 1pg 、 5pg 、 10pg 、 100pg あるいは 1ng になるようにそれぞれ添加した。

反応は、タカラPCRサーマルサイクルーパーソナルを使用し、Fastモードで行なった。反応条件は、*Taq DNA*ポリメラーゼおよび*Pyrobest DNA*ポリメラーゼの場合は、 98°C 、5秒～ 68°C 、2分を1サイクルとした30サイクルで、*ExTaq DNA*ポリメラーゼの場合は、 98°C 、5秒～ 68°C 、1分を1サイクルとした30サイクルで行なった。

一方、対照として、陽イオン錯体無添加の場合についても同様に行なった。

反応終了後、得られた各反応液 $5\mu\text{l}$ を 0.00005% のエチジウムプロマイドを含む2%アガロースゲルにて電気泳動し、泳動後のゲルに紫外線照射し増幅産物に由来するバンドを可視化することにより、增幅断片を確認した。

その結果、いずれの酵素を使用した場合においても塩化ヘキサンミンコバルト(III)を添加することにより、 1pg の鑄型DNA量でも増幅できることができた。一方、無添加の場合は、 1pg の鑄型DNA量では、増幅できなかつた。

実施例20 塩化ヘキサンミンコバルト(III)添加による低マグネシウム濃度反応液における増幅反応への影響

塩化ヘキサンミンコバルト(III)を使用して、通常用いる場合よりも低いマグネシウム濃度の反応液での増幅反応に対する影響を調べた。

各DNAポリメラーゼ用のマグネシウムフリーの $10\times\text{PCRバッファー}$ (いずれも宝酒造社製)を使用する以外は、DNAポリメラーゼおよび反応液組成は

、実施例17と同様にした。さらに、塩化マグネシウムに関しては、通常含有量より少ない量、Taq DNAポリメラーゼ（通常量1.5 mMに対して0.75 mM）、Pyrobest DNAポリメラーゼ（通常量1 mMに対して0.5 mM）、ExTaq DNAポリメラーゼ（通常量2 mMに対して1.25 mM）になるように添加した。さらに陽イオン錯体に関しては、Taq DNAポリメラーゼおよびPyrobest DNAポリメラーゼは、最終濃度が100 μMの塩化ヘキサアンミンコバルト(III)、ExTaq DNAポリメラーゼは、最終濃度が10 μMの塩化ヘキサアンミンコバルト(III)になるようにそれぞれ添加した。

反応は、タカラPCRサーマルサイクラーパーソナルを使用し、Fastモードで行なった。反応条件は、Taq DNAポリメラーゼおよびPyrobest DNAポリメラーゼの場合は、98 °C、5秒～68 °C、2分を1サイクルとした30サイクルで、ExTaq DNAポリメラーゼの場合は、98 °C、5秒～68 °C、1分を1サイクルとした30サイクルで行なった。

一方、対照として、陽イオン錯体無添加の場合についても同様に行なった。

反応終了後、得られた各反応液5 μlを0.00005%のエチジウムプロマイドを含む2%アガロースゲルにて電気泳動し、泳動後のゲルに紫外線照射し増幅産物に由来するバンドを可視化することにより、增幅断片を確認した。

その結果、全てのDNAポリメラーゼにおいて、マグネシウム濃度を通常含有量より少なくした場合、陽イオン錯体を加えることによって増幅できることを確認した。しかし、陽イオン錯体の無添加の場合は、増幅できなかった。

実施例21 塩化ヘキサアンミンコバルト(III)添加による低プライマー濃度反応液における増幅反応への影響

塩化ヘキサアンミンコバルト(III)を使用して、通常用いる場合よりも低いプライマー濃度の反応液での増幅反応に対する影響を調べた。

使用するDNAポリメラーゼおよび反応液組成は、実施例17と同様にした。但し、使用する2種類のプライマーの量を2、2.5、3.3、5、10あるいは20pmolになるようにそれぞれ添加した。さらに、陽イオン錯体に関しては、Taq DNAポリメラーゼおよびPyrobest DNAポリメラーゼは、最終濃度が100μMの塩化ヘキサンミンコバルト(III)、ExTaq DNAポリメラーゼは、最終濃度が50μMの塩化ヘキサンミンコバルト(III)になるようにそれぞれ添加した。

反応は、タカラPCRサーマルサイクラーパーソナルを使用し、Fastモードで行なった。反応条件は、Taq DNAポリメラーゼおよびPyrobest DNAポリメラーゼの場合は、98°C、5秒～68°C、2分を1サイクルとした30サイクルで、ExTaq DNAポリメラーゼの場合は、98°C、5秒～68°C、1分を1サイクルとした30サイクルで行なった。

一方、対照として、陽イオン錯体無添加の場合についても同様に行なった。

反応終了後、得られた各反応液5μlを0.00005%のエチジウムプロマイドを含む2%アガロースゲルにて電気泳動し、泳動後のゲルに紫外線照射し増幅産物に由来するバンドを可視化することにより、増幅断片を確認した。

その結果、Taq DNAポリメラーゼの場合は、陽イオン錯体存在下、2pmolのプライマー量でも増幅できることができた。一方、無添加の場合は増幅できなかった。次に、Pyrobest DNAポリメラーゼの場合は、陽イオン錯体存在下、3.3pmolのプライマー量でも増幅できることができた。一方、無添加の場合は増幅できなかった。さらに、ExTaq DNAポリメラーゼの場合は、陽イオン錯体存在下、2.5pmolのプライマー量でも増幅できることができた。一方、無添加の場合は増幅できなかった。

実施例22 塩化ヘキサンミンコバルト(III)添加による酵素量と増幅反応に対する影響

塩化ヘキサアンミンコバルト(III)を使用して、通常用いる場合の半分量の酵素での増幅反応に対する影響を調べた。

酵素は、Taq DNAポリメラーゼおよびExTaq DNAポリメラーゼを使用した。

使用するDNAポリメラーゼ量以外の反応液組成は、実施例17と同様にした。即ち、0.625UのDNAポリメラーゼを使用した。さらに、陽イオン錯体に関しては、Taq DNAポリメラーゼおよびPyrobest DNAポリメラーゼは、最終濃度が100μMの塩化ヘキサアンミンコバルト(III)、ExTaq DNAポリメラーゼは、最終濃度が50μMの塩化ヘキサアンミンコバルト(III)になるようにそれぞれ添加した。

反応は、タカラPCRサーマルサイクルパーソナルを使用し、Fastモードで行なった。反応条件は、Taq DNAポリメラーゼの場合は、98°C、5秒～68°C、2分を1サイクルとした30サイクルで、ExTaq DNAポリメラーゼの場合は、98°C、5秒～68°C、1分を1サイクルとした30サイクルで行なった。

一方、対照として、1.25UのDNAポリメラーゼを使用した陽イオン錯体無添加の場合についても同様に行なった。

反応終了後、得られた各反応液5μlを0.00005%のエチジウムブロマイドを含む2%アガロースゲルにて電気泳動し、泳動後のゲルに紫外線照射し増幅産物に由来するバンドを可視化することにより、増幅断片を確認した。

その結果、Taq DNAポリメラーゼおよびExTaq DNAポリメラーゼのいずれの場合においても陽イオン錯体存在下、通常使用量の半分量でも、無添加の場合の通常使用量とほぼ同等の増幅ができるることを確認した。

実施例23 高GC含有領域の増幅の場合における陽イオン錯体添加の効果

高GC含有領域をターゲットとしたPCR増幅の場合における陽イオン錯体添

加の効果を調べた。陽イオン錯体は、トリス（エチレンジアミン）コバルト(III)塩化物およびトリス（エチレンジアミン）ロジウム(III)3塩化物・3水和物を使用した。鑄型DNAは、HT 29細胞より常法に従って調製した。增幅領域および增幅鎖長については、ヒト ApoEゲノム領域、441 bpとした。この増幅領域のGC含量は、約74%であった。DNAポリメラーゼは、タカラLA-Taq DNAポリメラーゼ（宝酒造社製、以下LA-Taq DNAポリメラーゼと称す）を使用した。反応液組成を下記に示す。

反応液組成：

25 μlの2×GCバッファーI（宝酒造社製）、0.4 mMのdATP、dCTP、dGTPおよびdTTP、2.5 UのLA-Taq DNAポリメラーゼ、100 ngのHT 29細胞ゲノムDNAならびに20 pmolずつのプライマーApoE-1およびApoE-2（最終容量は50 μl）。前記反応液に、上記陽イオン錯体を、最終濃度50、100、200、500 μMになるようにそれぞれ添加した。

反応は、タカラPCRサーマルサイクルパーソナルを使用し、Fastモードで行なった。反応条件は、98°C、5秒～64°C、10秒～72°C、40秒を1サイクルとした30サイクルで行なった。一方、対照として、陽イオン錯体の無添加の場合についても同様に行なった。

反応終了後、得られた各反応液5 μlを0.00005%のエチジウムプロマイドを含む2%アガロースゲルにて電気泳動し、泳動後のゲルに紫外線照射し増幅産物に由来するバンドを可視化することにより、増幅断片を確認した。

その結果、トリス（エチレンジアミン）コバルト(III)塩化物を添加した場合、添加する濃度が増加するに従って、DNA合成反応が促進されていることが確認できた。また、トリス（エチレンジアミン）ロジウム(III)3塩化物・3水和物を添加した場合も100 μM、200 μM、500 μMと添加する濃度が増加するに従ってDNA合成反応が促進されていることが確認できた。しかし、いず

れの陽イオン錯体においても無添加の場合は、增幅できなかった。

実施例 24 陽イオン錯体を添加した場合の増幅鎖長への影響

陽イオン錯体を添加した場合の増幅鎖長への影響を調べた。陽イオン錯体は、ヘキサンミンコバルト(III) 3 塩化物を使用した。鑄型DNAは、大腸菌ゲノムあるいは λ DNAを使用した。プライマーは、Taq DNAポリメラーゼおよびPyrobest DNAポリメラーゼの場合は、Eco1 およびEco5 の組合せ、LA-Taq DNAポリメラーゼの場合は、 λ L36 および λ R485 の組合せで使用した。DNAポリメラーゼは、Taq DNAポリメラーゼ、Pyrobest DNAポリメラーゼおよびLA-Taq DNAポリメラーゼを使用した。反応液組成は、Taq DNAポリメラーゼおよびPyrobest DNAポリメラーゼの場合は、上記プライマー対および鑄型DNAとして大腸菌ゲノム 10 ng を使用した以外は、実施例 17 と同様にした。上記反応液に、Taq DNAポリメラーゼの場合は、最終濃度 10 μ M および 20 μ M となるようにヘキサンミンコバルト(III) 3 塩化物を、Pyrobest DNAポリメラーゼの場合は、最終濃度 50 μ M および 100 μ M となるようにヘキサンミンコバルト(III) 3 塩化物を添加した。対照として、陽イオン錯体無添加のものも調製した。

一方、LA-Taq DNAポリメラーゼを使用した場合の反応液組成を下記に示す。

5 μ l の 10 \times LA-PCR バッファー II (Mg^{2+} plus) (宝酒造社製)、0.4 mM の dATP、dCTP、dTTP および dTTP、および 2.5 U の LA-Taq DNAポリメラーゼ、1 ng の λ DNA、20 pmol ずつのプライマー λ L36 および λ R485 (最終容量は 50 μ l)。前記反応液に、ヘキサンミンコバルト(III) 3 塩化物を、最終濃度 50 μ M になるように添加した。対照として、陽イオン錯体の無添加の場合についても同様に調製した

o

反応は、タカラPCRサーマルサイクラーパーソナルを使用し、Fastモードで行なった。反応条件は、Taq DNAポリメラーゼおよびPyrobest DNAポリメラーゼの場合は、98°C、5秒～68°C、10分を1サイクルとした30サイクルで行なった。LA-Taq DNAポリメラーゼの場合は、94°C、1分間処理後、98°C、10秒～68°C、15分を1サイクルとした30サイクルで行ない、72°C、15分で反応を完了させた。

反応終了後、得られた各反応液5μlを0.00005%のエチジウムプロマイドを含む1%アガロースゲルにて電気泳動し、泳動後のゲルに紫外線照射し増幅産物に由来するバンドを可視化することにより、増幅断片を確認した。

その結果、Taq DNAポリメラーゼを使用した場合、いずれの濃度のヘキサアンミンコバルト(III)3塩化物を添加した場合においても目的のDNA断片が良好に増幅できた。しかし、無添加の場合は、わずかに増幅されるのみであった。次にPyrobest DNAポリメラーゼを使用した場合、いずれの濃度のヘキサアンミンコバルト(III)3塩化物を添加した場合においても目的のDNA断片が良好に増幅できた。しかし、無添加の場合は、わずかに増幅されるのみであった。さらに、LA-Taq DNAポリメラーゼを使用した場合、ヘキサアンミンコバルト(III)3塩化物を添加した場合において、目的のDNA断片が良好に増幅できた。しかし、無添加の場合、目的DNA断片は、わずかに増幅されるのみであった。

産業上の利用可能性

本発明により、DNAポリメラーゼによるDNA合成反応を促進するDNA合成反応促進剤が提供される。該促進剤は各種のDNAポリメラーゼに対して作用を示し、そのDNA合成反応を促進する。また、本発明は高効率でのDNA合成を可能とするDNA合成反応用組成物を提供する。本発明のDNA合成反応促進

剤およびDNA合成反応用組成物は、DNAポリメラーゼが使用される各種の工程、例えば、PCR法などに利用することができ、遺伝子工学研究用試薬として利用できる。

請求の範囲

1. 酸性物質および陽イオン錯体からなる群より選択された少なくとも 1 種を含有してなる DNA 合成反応促進剤。
2. 酸性物質が酸性高分子物質である請求項 1 記載の DNA 合成反応促進剤。
3. 酸性高分子物質が酸性多糖である請求項 2 記載の DNA 合成反応促進剤。
4. 酸性高分子物質が、フコース硫酸含有多糖、デキストラン硫酸、カラギーナン、ヘパリン、ラムナン硫酸、デルマタン硫酸（コンドロイチン硫酸 B）、ヘパラン硫酸、ヒアルロン酸、アルギン酸、ペクチン、ポリグルタミン酸、ポリアクリル酸、ポリビニル硫酸、ポリスチレン硫酸、カラギーナン、DNA およびそれらの塩からなる群より選択された 1 種以上である請求項 2 または 3 記載の DNA 合成反応促進剤。
5. フコース硫酸含有多糖がフコース硫酸含有多糖 - F またはフコース硫酸含有多糖 - U である請求項 4 記載の DNA 合成反応促進剤。
6. 陽イオン錯体が遷移金属錯体である請求項 1 記載の DNA 合成反応促進剤。
7. 遷移金属錯体中の中心原子が元素周期表のVIII族の遷移元素である請求項 6 記載の DNA 合成反応促進剤。
8. 遷移元素が、コバルト、ロジウムおよびイリジウムからなる群より選択さ

れた 1 種以上である請求項 7 記載のDNA合成反応促進剤。

9. 遷移金属錯体が $[Co(NH_3)_6]Cl_3$ 、 $[Co(H_2NCH_2CH_2NH_2)_3]Cl_3$ および $[Rh(H_2NCH_2CH_2NH_2)_3]Cl_3$ からなる群より選択された 1 種以上である請求項 8 記載のDNA合成反応促進剤。

10. DNA合成反応を行なうに際し、請求項 1 ~ 9 いずれか記載のDNA合成反応促進剤の存在下にDNAポリメラーゼを用いて反応を行なうことを特徴とするDNA合成方法。

11. 2種以上のDNAポリメラーゼを使用する請求項 10 記載のDNA合成方法。

12. 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼと3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有さないDNAポリメラーゼとを使用する請求項 11 記載のDNA合成方法。

13. 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する 2種以上のDNAポリメラーゼを使用する請求項 11 記載のDNA合成方法。

14. α 型のDNAポリメラーゼと、非 α 非ポル I 型のDNAポリメラーゼとを使用する請求項 13 記載のDNA合成方法。

15. ポリメラーゼ チェーン リアクション (PCR) 法により行なう請求項 10 ~ 14 いずれか記載のDNA合成方法。

1 6. 請求項 1 ~ 9 いずれか記載のDNA合成反応促進剤を含有してなるDNA合成反応用組成物。

1 7. さらにDNAポリメラーゼを含有してなる請求項 1 6 記載のDNA合成反応用組成物。

1 8. 2種以上のDNAポリメラーゼを含有してなる請求項 1 7 記載のDNA合成反応用組成物。

1 9. 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを含有してなる請求項 1 8 記載のDNA合成反応用組成物。

2 0. α 型のDNAポリメラーゼと、非 α 非ポルI型のDNAポリメラーゼとを含有してなる請求項 1 9 記載のDNA合成反応用組成物。

2 1. 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼと3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有さないDNAポリメラーゼを含有してなる請求項 1 8 記載のDNA合成反応用組成物。

2 2. 3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを含有してなるDNA合成反応用組成物。

2 3. α 型のDNAポリメラーゼと、非 α 非ポルI型のDNAポリメラーゼとを含有してなる請求項 2 2 記載のDNA合成反応用組成物。

2 4. DNA合成反応を行なうに際し、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を

有する2種以上のDNAポリメラーゼを使用することを特徴とするDNA合成方法。

25. α 型のDNAポリメラーゼと、非 α 非ポルI型のDNAポリメラーゼとを使用する請求項24記載のDNA合成方法。

26. ポリメラーゼ チェーン リアクション（PCR）法により行なう請求項24または25記載のDNA合成方法。

27. 試験管内DNA合成に使用されるキットであって、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を有する2種以上のDNAポリメラーゼを含有してなるキット。

28. α 型のDNAポリメラーゼと、非 α 非ポルI型のDNAポリメラーゼとを含有してなる請求項27記載のキット。

29. さらにDNA合成に使用される試薬を含有してなる請求項27または28記載のキット。

30. DNAポリメラーゼが耐熱性DNAポリメラーゼである請求項27～29いずれか記載のキット。

31. 試験管内DNA合成に使用されるキットであって、請求項1～9いずれか記載のDNA合成反応促進剤およびDNAポリメラーゼを含有してなるキット。

32. さらにDNA合成に使用される試薬を含有してなる請求項31記載のキ

ット。

3 3. 2種以上のDNAポリメラーゼを含有してなる請求項3 1または3 2記載のキット。

3 4. DNAポリメラーゼが耐熱性DNAポリメラーゼである請求項3 1～3 3いずれか記載のキット。

SEQUENCE LISTING

<110> Takara Shuzo Co., Ltd.

<120> A method for DNA synthesis

<130> 99-017-PCT

<150> JP 10-114005

<151> 1998-4-23

<150> JP 10-315243

<151> 1998-11-6

<160> 18

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 1

gatgagttcg tgtccgtaca act

23

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<213> Artificial Sequence

<400> 2

acaaagccag ccggaatatac tg

22

<210> 3

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 3

gatgagttcg tgtccgtaca actggcgtaa tcatg

35

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

ggttatcgaa atcagccaca gcgcc

25

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

gcgtaccctt gtctcacggg caa

23

<210> 6

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

gatagctgtc gtcataggac tc

22

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7

cttaaccagt gcgcgtgactg act

23

<210> 8

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

ttgccacttc cgtcaaccag gcttatca

28

<210> 9

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

tgtccgtcag ctcataacgg tacttcacg

29

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 10

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

atatctggcg gtgcaatatac ggtactgt

28

<210> 11

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 11

gacaatctgg aatacgccac ctgacttg

28

<210> 12

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 12

gggcggcgac ctcgcgggtt ttgcgtattt atgaaa

36

<210> 13

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<400> 13

taacctgtcg gatcaccgga aaggaccgt aaagtg

36

<210> 14

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 14

ggtggcgatg caaatgcaat cttcggtgcc ccaac

35

<210> 15

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 15

ttatgtatgc cgcttatcag cttcatgtct ggctc

35

<210> 16

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 16

atcatctaac ctgttctgga aaacgcttgc gcagc

35

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 17

aagcgccctgg cagtgtacc

19

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 18

cttcggcggtt cagtgattgt c

21

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02121

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ C12N15/10, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁶ C12N15/10, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Tigst, D. et al., "The Effects of Plant Polysaccharides and Buffer Additives on PCR" BioTechniques (1992) Vol. 12, No. 3 p.332-334	1-34
A	Suzanne C. et al., "Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) Vol. 91, No. 12 p.5695-5699	1-34
A	JP, 6-277062, A (F.Hoffmann-La Roche AG.), 4 October, 1994 (04. 10. 94) & EP, 590327, A2 & CA, 2105944, A & US, 5501963, A	1-34
A	Roman, J. et al., "Reversal of RT-PCR Inhibition Observed in Heparinized Clinical Specimens" BioTechniques (1997) Vol. 23, No. 1 p.24-28	1-34

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
7 July, 1999 (07. 07. 99)Date of mailing of the international search report
21 July, 1999 (21. 07. 99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02121

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Gunnar, T. et al., "Optimization of PCR to Yield Successful Amplification From Heparin-Contaminated DNA" Methods Mol. Cel. Biol. (1995) Vol. 5, No. 2 p.122-124	1-34

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/02121

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. C1° C12N15/10, C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. C1° C12N15/10, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリーエ	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Tigst, D. et al. "The Effects of Plant Polysaccharides and Buffer Additives on PCR" BioTechniques (1992) 第12巻 第3号 p. 332-334	1-34
A	Suzanne C. et al. "Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA" Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1994) 第91巻 第12号 p. 5695-5699	1-34
A	JP, 6-277062, A (エフ. ホフマン-ラ ロシュ アクチエン ゲゼルシャフト) 4. 10月. 1994 (O 4. 10. 94) & EP, 590327, A2 & CA, 2105944, A & US, 5501963, A	1-34

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリーエ

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.07.99

国際調査報告の発送日

21.07.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

引地 進

4N 9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	Roman, J. et al. "Reversal of RT-PCR Inhibition Observed in Heparinized Clinical Specimens" BioTechniques (1997) 第23巻 第1号 p. 24-28	1-34
A	Gunnar, T. et al. "Optimization of PCR to Yield Successful Amplification From Heparin-Contaminated DNA" Methods Mol. Cel. Biol. (1995) 第5巻 第2号 p. 122-124	1-34